

Данное изобретение относится к области вирусологии.

В последние десятилетия определены несколько этиологических возбудителей болезней млекопитающих, в особенности заболеваний дыхательных путей (RTI), в особенности у людей<sup>7</sup>. Классическими этиологическими возбудителями RTI у млекопитающих являются респираторно-синцитиальные вирусы, принадлежащие к роду *Pneumovirus*, обнаруженные у людей (hRSV) и жвачных, таких как крупный рогатый скот или овцы (bRSV и/или oRSV). У RSV человека для определения 2 антигенных подгрупп hRSV используют отличия в обратном анализе перекрестной нейтрализации, иммунологическом анализе реактивности белков G и нуклеотидных последовательностях гена G. В пределах подгрупп идентичность аминокислотных последовательностей составляет 94% (подгруппа A) и 98% (подгруппа B), тогда как обнаруженный уровень идентичности аминокислотных последовательностей между подгруппами составляет всего 53%. Дополнительное разнообразие в подгруппах наблюдали, основываясь на применении моноклональных антител, анализах RT-PCR и анализах защиты от РНКазы. Вирусы обеих подгрупп распространены во всем мире и могут встречаться во время одного сезона. Инфицирование может происходить при наличии предсуществующего иммунитета, а изменения антигенов не являются строго необходимыми для возникновения повторного инфицирования. См., например, Sullender, W.M., Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. Clinical Microbiology Reviews, 2000. 13(1): p. 1-15; Collins, P.L., McIntosh, K. and Chanock, R.M., Respiratory syncytial virus. Fields virology, ed. B. N. Knipe, Howley, P.M. 1996, Philadelphia: lippencott-raven. 1313-1351; Johnson, P.R., et al., The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 1987. 84(16): p. 5625-9; Collins, P.L., The molecular Biology of Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) of the Genus Pneumovirus, in The Paramyxoviruses, D.W. Kingsbury, Editor. 1991, Plenum Press: New York. p. 103-153.

Другим классическим *Pneumovirus* является вирус пневмонии мышей (PVM), вообще обнаруженный только у лабораторных мышей. Однако, часть заболеваний, наблюдающихся у млекопитающих, все еще нельзя приписать известным патогенным микроорганизмам.

Изобретение относится к изолированному РНК-содержащему вирусу с одннитевой антисмысловой РНК, существенно характерному для млекопитающих (MPV), принадлежащему к подсемейству *Pneumovirinae* семейства *Paramyxoviridae* и определяемому как филогенетически соответствующий роду *Metapneumovirus*. Указанный вирус определяют как филогенетически соответствующий роду *Metapneumovirus* посредством определения нуклеотидной последовательности указанного вируса и проверки ее, например, посредством филогенетических анализов, где строят деревья максимального правдоподобия с применением 100 условий инициализации и 3 перестановок, и нахождения ее более тесно филогенетически соответствующей вирусному изоляту, депонированному в CNCM, Paris как I-2614, чем соответствующей вирусному изоляту пневмовируса птиц (APV), также известному как вирус ринотрахеита индеек (TRTV), этиологическому возбудителю ринотрахеита птиц. Для указанного филогенетического анализа наиболее полезно получить нуклеотидную последовательность не-MPV, в качестве внешней группы для сравнения, наиболее подходящий изолят для внешней группы можно получить из серотипа С пневмовируса птиц (C-APV), как, например, продемонстрировано здесь на фиг. 5.

Хотя филогенетические анализы предоставляют удобный способ определения такого вируса, как MPV, здесь представлены несколько других, возможно более прямых, хотя в чем-то более ясных способов идентификации указанного вируса или вирусных белков или нуклеиновых кислот указанного вируса. Практически MPV можно идентифицировать посредством установления процентов гомологии вируса, белков или нуклеиновых кислот при сравнении с изолятами, вирусными белками или нуклеиновыми кислотами, идентифицированными здесь по последовательности или вкладу. Широко известно, что вид вирусов, особенно вид РНК-вирусов, часто составляет квазивид, где кластер указанных вирусов обнаруживает гетерогенность среди его представителей. Таким образом, ожидают, что каждый изолят может обладать несколько отличным процентом родства с одним из различных изолятов, как представлено здесь.

При желании сравнить с депонированным вирусом I-2614, изобретение представляет изолированный РНК-содержащий вирус с одннитевой антисмысловой РНК, существенно характерный для млекопитающих (MPV), принадлежащий к подсемейству *Pneumovirinae* семейства *Paramyxoviridae* и определяемый как филогенетически соответствующий роду *Metapneumovirus* посредством определения аминокислотной последовательности указанного вируса и определения того, что указанная аминокислотная последовательность обладает существенно большей степенью гомологии аминокислот с вирусным изолятом, депонированным в CNCM, Paris как I-2614, чем представленные здесь для белка L, белка M, белка N, белка Р или белка F, при сравнении с APV-С или подобным; изолированный РНК-содержащий вирус с одннитевой антисмысловой РНК, существенно характерный для млекопитающих (MPV), принадлежащий к подсемейству *Pneumovirinae* семейства *Paramyxoviridae*, представляют как идентифицируемый в качестве филогенетически соответствующего роду *Metapneumovirus* посредством определения нуклеотидной последовательности указанного вируса и определения того, что указанная нуклеотидная последовательность обладает существенно большей степенью идентичности нуклеиновой кислоты с вирусным изолятом, депонированным в CNCM, Paris как I-2614, чем определенные здесь нуклеиновые кислоты,

кодирующие белок L, белок M, белок N, белок P или белок F, как здесь определено ниже, в сравнении с APV-C.

Опять же, как правило, когда изоляты, или вирусные белки или нуклеиновые кислоты изолятов, которые необходимо идентифицировать, обладают процентами гомологии, которые попадают в пределы и границы процентов гомологии, идентифицированных здесь для обеих обособленных групп, беря как соответствующие изоляты для сравнения изоляты 00-1 или 99-1, можно рассматривать MPV как принадлежащий к одной из двух идентифицированных здесь серологических групп MPV. Однако когда проценты гомологии ниже или когда необходимо в большей степени отличить вирусные изоляты, например, от APV-C, лучше обратиться к идентифицированному здесь филогенетическому анализу.

Опять же нужно иметь в виду, что при выборе других изолятов для определения процентов гомологии, указанные проценты могут немного изменяться.

Вместе с данным MPV, изобретение относится к диагностическим средствам и способам диагностики, и терапевтическим средствам и способам терапии для применения в диагностике и/или лечении заболевания, в частности респираторного заболевания, в особенности млекопитающих, более конкретно, людей. Однако из-за генетического родства, хотя и отдаленного, существенно характерного для MPV млекопитающих с существенно характерным для APV птиц, в частности с APV-C, изобретение также относится к средствам и способам, применимым для диагностики и лечения болезни птиц. В вирусологии наиболее рекомендуемым является проведение диагностики и/или лечения конкретной вирусной инфекции реагентами, наиболее специфичными для указанного конкретного вируса, вызывающего указанную инфекцию. В данном случае это означает, что предпочтительно проводить указанные диагностику и/или лечение инфекции MPV реагентами, наиболее специфичными для MPV. Однако это ни в коем случае не исключает возможность применения менее специфичного, но в достаточной степени перекрестно реагирующего агента, т.к. он, например, легче доступен и в достаточной мере решает поставленную задачу. Именно это здесь, например, представлено для проведения вирусологической и/или серологической диагностики инфекций MPV у млекопитающих реагентами, полученными из APV, в частности реагентами, полученными из APV-C; здесь в подробном описании, например, показано, что достаточно надежный серологический диагноз инфицирования MPV у млекопитающих можно выполнять с применением ELISA, конкретно предназначенного для обнаружения антител APV у птиц. Особенно применимым для данной цели тестом является тест ELISA, предназначенный для определения антител APV (например, в сыворотке или яичном желтке), коммерчески доступная версия которого известна как APV-Ab SVANOVIR® и производимая SVANOVA Biotech AB, Uppsala Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala Sweden. Обратная ситуация также может иметь место: именно это здесь представлено, например, для проведения вирусологической и/или серологической диагностики инфекций APV у млекопитающих реагентами, полученными из MPV; здесь, в подробном описании, например, показано, что достаточно надежный серологический диагноз инфекций APV у птиц можно выполнять с применением ELISA, предназначенного для обнаружения антител MPV. Принимая во внимание, что антигены и антитела обладают связью типа «ключ-замок», обнаружение различных антигенов можно выполнять посредством выбора подходящего антитела, обладающего существенной перекрестной реактивностью. Конечно, для уверенности в такой перекрестной реактивности, лучше всего выбирать реагенты (такие как антигены или антитела), руководствуясь гомологиями аминокислот, существующими у различных (глико)протеинов различных вирусов, из-за чего реагенты, связывающие большинство гомологичных белков, будут наиболее применимы в тестах, зависящих от указанной перекрестной реактивности.

Для детекции нуклеиновой кислоты даже проще, вместо подбора праймеров или зондов, основанных на гетерологичных нуклеотидных последовательностях различных вирусов, что, таким образом, позволяет выявить отличия между вирусами *Metapneumovirus*, характерными для млекопитающих и птиц, подбирать или выбирать праймеры или зонды, основанные на тех участках нуклеотидных последовательностей, специфичных для вируса, в которых показана высокая степень гомологии. В общем, для нуклеотидных последовательностей, гомология 90% или выше гарантирует достаточную перекрестную реактивность, чтобы быть уверенным в диагностических тестах, применяющих жесткие условия гибридизации.

Изобретение, например, относится к способу для вирусологической диагностики инфекции MPV животных, конкретно млекопитающих, еще конкретнее человека, включающему определение в образцах от указанных животных присутствия вирусного изолята или его компонентов посредством реакции указанного образца с MPV-специфичной нуклеиновой кислотой или с антителом по изобретению, и к способу серологической диагностики инфекции MPV млекопитающих, включающему определение в образцах от указанных животных присутствия антитела, специфически направленного против MPV или его компонента, посредством реакции указанного образца со специфичной для MPV белковой молекулой или ее фрагментом или антигеном по изобретению. Также изобретение относится к диагностическому набору для диагностики инфекции MPV, включающему MPV, специфичную для MPV нуклеиновую кислоту, белковую молекулу или ее фрагмент, антиген и/или антитело по изобретению, и, предпочтительно, средство для детекции указанного MPV, специфичной для MPV нуклеиновой кислоты, белковой молекулы или ее фрагмента, антигена и/или антитела, указанное средство, например, включает легко воз-

будимую группу, такую как флуорофор или систему ферментной детекции, применяющуюся в данной области (примеры подходящего диагностического набора включают IF, ELISA, анализ нейтрализации, анализ RT-PCR). Для определения того, можно ли пока еще неидентифицированный вирусный компонент или его синтетический аналог, такой как нуклеиновая кислота, белковая молекула или их фрагмент, идентифицировать как специфичные для MPV, достаточно проанализировать указанную нуклеотидную или аминокислотную последовательность, предпочтительно по меньшей мере из 10, более предпочтительно по меньшей мере из 25, более предпочтительно из 40 нуклеотидов или аминокислот (соответственно), путем сравнения гомологии последовательности с известными последовательностями MPV или с известными последовательностями не-MPV (предпочтительно использовать последовательности APV-C) с применением, например, филогенетического анализа, как представлено здесь. Компонент или его синтетический аналог можно идентифицировать в зависимости от степени родства с указанными последовательностями MPV или не-MPV.

Изобретение также относится к способу для вирусологической диагностики инфекции MPV у млекопитающего, включающий определение присутствия вирусного изолята или его компонента в образце от указанного млекопитающего посредством взаимодействия указанного образца с перекрестно реагирующей нуклеиновой кислотой, полученной из APV (предпочтительно серотип C), или с перекрестно реагирующим антителом, реактивным в отношении указанного APV, и к способу серологической диагностики инфекции MPV у млекопитающего, включающему определение в образце от указанного млекопитающего присутствия перекрестно реагирующего антитела, также направленного против APV или его компонента, посредством взаимодействия указанного образца с белковой молекулой, или ее фрагментом или антигеном, полученным из APV. Более того, изобретение относится к применению диагностического набора, изначально предназначенного для детекции APV или антител к APV, для диагностики инфекции MPV, конкретно для детекции указанной инфекции MPV у людей.

Изобретение также относится к способу для вирусологической диагностики инфекции APV у птицы, включающему определение присутствия вирусного изолята или его компонента в образце от указанной птицы посредством взаимодействия указанного образца с перекрестно реагирующей нуклеиновой кислотой, полученной из MPV или с перекрестно реагирующим антителом, реактивным в отношении указанного MPV, и способу серологической диагностики инфекции APV у птицы, включающему определение в образце от указанной птицы присутствия перекрестно реагирующего антитела, также направленного против MPV или его компонента, посредством взаимодействия указанного образца с белковой молекулой, или ее фрагментом, или антигеном, полученным из MPV. Более того, изобретение относится к применению диагностического набора, изначально предназначенного для детекции MPV или антител к MPV, для диагностики инфекции APV, конкретно для детекции указанной инфекции APV у домашней птицы, такой как курица, утка или индейка.

Как указано, при лечении подобное применение можно проводить из-за обнаруженной перекрестной реактивности, в частности, когда обстоятельства делают применение более гомологичного подхода менее простым. Например, препаратами вакцин, полученных из изолятов APV (предпочтительно серотип C), можно проводить неотложные вакцинации, такие как экстренные вакцинации против инфекций MPV, когда более гомологичная вакцина против MPV недоступна и, наоборот, можно рассмотреть вакцинации против инфекций APV препаратами вакцин, полученных из MPV. Также способы обратной генетики делают возможным создание химерных вирусных конструкций APV-MPV, пригодных как вакцина, достаточно отличающаяся от полевых изолятов каждого из соответствующих штаммов, подлежащая аттенуации до требуемого уровня. Подобные способы обратной генетики также сделают возможным получение химерных парамиксовирусных-метапневмовирусных конструкций, таких как RSV-MPV или PI3-MPV, для применения в препаратах вакцин. Такие конструкции особенно применимы в качестве сочетанной вакцины для борьбы с заболеваниями дыхательных путей.

Таким образом, изобретение относится к новому этиологическому возбудителю, изолированному РНК-содержащему вирусу с однонитевой антисмысловой РНК, существенно характерному для млекопитающих (также обозначаемый здесь как MPV), принадлежащему к подсемейству Pneumovirinae семейства Paramyxoviridae, но не идентифицируемому как классический пневмовирус, и принадлежащему к роду *Metapneumovirus*, и специфичным для MPV компонентам или их синтетическим аналогам. До настоящего времени не найдены вирусы млекопитающих, подобные метапневмовирусам, например, метапневмовирусы, выделяемые из млекопитающих, по существу, выступающих в качестве природных хозяев для указанного вируса, или вызывающие заболевание указанных млекопитающих. Метапневмовирусы, в общем, рассматриваемые как, по существу, ограниченные домашней птицей в качестве природного хозяина или как этиологический возбудитель их заболеваний, также известны как пневмовирусы птиц. В последнее время описан изолят APV уток (FR 2801607), дополнительно демонстрирующий, что инфекции APV существенно ограничены птицами в качестве природных хозяев.

Изобретение относится к изолированному пневмовирусу млекопитающих (также называемому здесь MPV), с порядком генов и аминокислотной последовательностью, отличающимися от порядка генов рода *Pneumovirus* и близкородственному с родом *Metapneumovirus* подсемейства Pneumovirinae семейства Paramyxoviridae, а, принимая во внимание их филогенетическое родство, возможно принадле-

жащему к нему. Хотя до сих пор метапневмовирусы изолировали только из птиц, в настоящее время показано, что родственные, хотя и отличные по своей природе, вирусы можно идентифицировать в других видах животных, таких как млекопитающие. Авторы настоящего изобретения демонстрируют повторное выделение MPV у людей, несмотря на то, что таких сообщений для APV не существует. Более того, в отличие от APV, MPV, по существу, или совсем не реплицируется у кур и индеек, или реплицируется плохо, тогда как легко это делает у макаков-крабоедов. Сообщений о репликации APV у млекопитающих не обнаружено. Кроме того, тогда как специфичные антисыворотки, активированные против MPV, нейтрализуют MPV, антисыворотки, активированные против APV A, B или C, не нейтрализуют MPV в той же самой степени, и данное отсутствие полной перекрестной реактивности представляет другое доказательство того, что MPV является особым метапневмовирусом. Более того, там, где APV и MPV обладают одинаковым порядком генов, белки G и белки SH MPV существенно отличаются от таковых, известных для APV, по причине того, что для них не показано значимой гомологии последовательности ни на уровне аминокислот, ни на уровне нуклеиновой кислоты. Диагностические анализы для различения изолятов APV и MPV, или антител, направленных против данных различных вирусов, можно разработать, преимущественно взяв за основу один или оба данных белка (примерами являются IF, ELISA, анализ нейтрализации, анализ RT-PCR). Однако для различения APV и MPV можно также применять информацию о последовательности и/или антигенах, полученную из более родственных белков MPV N, P, M, F и L, и анализы гомологии последовательности соответствующих белков APV. Например, филогенетические анализы информации о последовательности, полученной для MPV, выявили, что MPV и APV являются двумя различными вирусами. В частности, филогенетическое дерево демонстрирует, что APV и MPV являются двумя различными вирусными родами. Авторы настоящего изобретения также показали, что MPV циркулирует в популяции людей по меньшей мере 50 лет, поэтому межвидовой перенос, вероятно, произошел по меньшей мере 50 лет назад и не является повседневным явлением. Возможно из-за того, что CPE у MPV фактически неразличим от CPE, вызванного hRSV или hPIV-1 в tMK или других клеточных культурах, MPV до сих пор удавалось уходить незамеченным. tMK (третичные клетки почки обезьяны, т.е. клетки MK на третьем пассаже в клеточной культуре) предпочтительно применяют ввиду их малой стоимости в сравнении с первичными или вторичными культурами. CPE, также как и для классических Paramyxoviridae, характеризуется образованием синцития, после чего клетки демонстрировали быстрое внутреннее разрушение с последующим их отделением от монослоя. Обычно (но не всегда) CPE обнаруживали в клетках после трех пассажей вируса из оригинального материала с 10 по 14 сутки после инокуляции, немного позднее, чем CPE, вызванный другими вирусами, такими как hRSV или hPIV-1.

Традиционно, как разрушительные возбудители заболевания, парамиксовирусы каждый год служат причиной множества летальных исходов у животных и людей во всем мире. Paramyxoviridae формируют семейство в порядке Mononegavirales (РНК-содержащие вирусы с однонитевой антисмысловой РНК), состоящее из подсемейств Paramyxovirinae и Pneumovirinae. Последнее подсемейство в настоящее время таксономически подразделяют на рода Pneumovirus и Metapneumovirus<sup>1</sup>. Респираторно-синцитиальный вирус человека (hRSV), типовой вид рода Pneumovirus, является единственной наиболее важной причиной инфекций нижних дыхательных путей в младенчестве или раннем детстве в мире<sup>2</sup>. Другие представители рода Pneumovirus включают бычий и овечий респираторно-синцитиальные вирусы и вирус пневмонии мышей (PVM).

Пневмовирус птиц (APV), также известный как вирус ринотрахеита индеек (TRTV), этиологический возбудитель ринотрахеита птиц, инфекции верхних дыхательных путей индеек<sup>3</sup>, является единственным представителем недавно описанного рода Metapneumovirus, который, как указано выше, до сих пор не ассоциирован с инфекциями, или, самое главное, с заболеванием млекопитающих. Серологические подгруппы APV можно дифференцировать на основании нуклеотидных или аминокислотных последовательностей гликопroteина G и анализ нейтрализации с использованием моноклональных антител, которые также распознают гликопротеин G. В подгруппах A, B и D идентичность аминокислотной последовательности белков G в пределах подгрупп составляет от 98,5% до 99,7%, тогда как идентичность аминокислот между подгруппами наблюдалась в пределах 31,2-38%. См., например, Collins, M.S., Gough, R.E. and Alexander, D.J., Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. Avian Pathology, 1993. 22: p. 469-479.; Cook, J.K.A., Jones, B.V., Ellis, M.M., Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. Avian Pathology, 1993. 22: p. 257-273; Bayon-Auboyer, M.H., et al., Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. J Gen Virol, 2000. 81 (Pt 11): p. 2723-33; Seal, B.S., Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. Virus Res, 1998. 58 (1-2): p. 45-52; Bayon-Auboyer, M.H., et al., Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. Arch Virol, 1999. 144 (6): p. 1091-109; Juhasz, K. and A.J. Easton, Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. J Gen Virol, 1994. 75 (Pt 11): p. 2873-80.

Дополнительный серотип APV представлен в WO0020600, в котором описан изолят APV Colorado и сравнен с известными штаммами APV или TRT посредством тестов нейтрализации сыворотки *in vitro*.

Сначала изолят Colorado тестировали по отношению к моноспецифичным поликлональным антисывороткам для распознавания изолятов TRT. Моноспецифичные поликлональные антисыворотки к любому из изолятов TRT не нейтрализовали изолят Colorado. Однако его нейтрализовала гипериммунная антисыворотка, активированная против штамма подгруппы А. Данная антисыворотка нейтрализовала гомологичный вирус при титре 1:400, а изолят Colorado - при титре 1:80. Далее, с применением указанного выше способа, изолят Colorado тестировали по отношению к моноклональным антителам к TRT. В каждом случае, титр обратной нейтрализации составил <10. Моноспецифичную антисыворотку, активированную против изолята Colorado, также тестировали по отношению к штаммам TRT обеих подгрупп. Антисыворотка к изоляту Colorado не нейтрализовала ни один из штаммов TRT.

Штамм APV Colorado не защищал цыплят SPF от заражения штаммами вируса TRT любой из подгрупп А или В. Данный результат означает, что изолят Colorado может быть первым примером дальнейшего серотипирования пневмовируса птиц, что также предлагали Bayon-Auboyer et al. (J. Gen. Vir. 81:2723-2733 (2000)).

В предпочтительном осуществлении, изобретение относится к изолированному MPV, таксономически соответствующему метапневмовирусу (неизвестного в настоящее время млекопитающего), с порядком генов, отличающимся от последовательности генов у пневмовирусов подсемейства Pneumovirinae семейства Paramyxoviridae. Классификация двух родов первоначально основывается на совокупности их генов: у метапневмовирусов, как правило, отсутствуют неструктурные белки, такие как NS1 или NS2 (см. также Randhawa et al., J. Vir. 71:9849-9854 (1997)) и порядок генов отличается от порядка генов у пневмовирусов (RSV: '3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5', APV:'3-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')<sup>4,5,6</sup>. Посредством анализа EM обнаружено, что представленный по настоящему изобретению MPV или таксономически соответствующие ему изоляты представляют собой частицы, подобные парамиксовирусам. По классификации MPV, филогенетически или таксономически соответствующие ему вирусные изоляты чувствительны к обработке хлороформом, оптимально культивируются в клетках tMK или функционально эквивалентных им клетках, и существенно зависят от трипсина в большинстве клеточных культур. Более того, типичный CPE или отсутствие гемагглютинирующей активности в отношении большинства традиционно использующихся красных клеток крови означает, что так, как представлено здесь, вирус, хотя и отдаленно, родственен с классическими пневмовирусами, такими как RSV. Хотя большинство парамиксовирусов обладает гемагглютинирующей активностью, у большинства пневмовирусов она отсутствует<sup>13</sup>. MPV по изобретению также содержит вторую перекрывающую ORF (M2-2) во фрагменте нукleinовой кислоты, кодирующем белок M2, как, в общем, в большинстве других пневмовирусов, например, как показано у Ahmadian et al., J. Gen. Vir. 80:2011-2016 (1999).

Для обнаружения дополнительных вирусных изолятов, представленных по настоящему изобретению, достаточно проверить образец, необязательно полученный от больного животного или человека, на предмет присутствия вируса подсемейства Pneumovirinae, и проверить полученный таким образом вирус на предмет присутствия генов, кодирующих (функциональные) NS1 или NS2, или, по существу, показать порядок генов, отличный от порядка генов пневмовирусов, таких как RSV, как уже обсуждалось выше. Более того, вирусные изоляты, филогенетически и, таким образом, таксономически соответствующие MPV, можно обнаружить посредством экспериментов по перекрестной гибридизации с использованием нукleinовой кислоты из изолята MPV, как представлено здесь, или в традиционных перекрестных серологических экспериментах с использованием моноклональных антител, специфически направленных против изолятов MPV, и/или антигенов, и/или иммуногенов, конкретно полученных из них.

Вновь выделенные вирусы филогенетически и, таким образом, таксономически соответствуют MPV тогда, когда содержат порядок генов и/или аминокислотную последовательность, достаточно сходную с изолятом(и)-прототипом(ами) MPV авторов настоящего изобретения, или структурно ему(им) соответствует(ют) и когда показано близкое родство с родом *Metapneumovirus* подсемейства Pneumovirinae. Как можно заключить из сравнения представленных на фиг. 6 последовательностей с последовательностями других вирусов, в частности APV-C, наибольшая гомология аминокислотной последовательности MPV с любым из других известных в настоящее время вирусов этого же семейства (APV подтип C) и определение структурного соответствия на уровне отдельного белка представляет собой 87% для белка матрикса, 88% для нуклеопротеина, 68% для фосфопротеина, 81% для белка слияния и 56-64% для частей белка полимеразы. Отдельные белки или целые вирусные изоляты с соответственно большей гомологией, чем упомянутые данные максимальные значения, рассматривают как филогенетически и, таким образом, таксономически соответствующие MPV и содержащие нуклеотидную последовательность, структурно соответствующую последовательности, показанной на фиг. 6. Таким образом, настоящее изобретение относится к вирусу, филогенетически соответствующему депонированному вирусу. Нужно заметить, что, подобно другим вирусам, между различными изолятами изолированного РНК-содержащего вируса с одноклетевой антисмысловой РНК, существенно характерного для млекопитающих, как представлено здесь, обнаружена определенная степень изменчивости. На филогенетических деревьях авторы настоящего изобретения идентифицировали по меньшей мере 2 генетических кластера вирусных изолятов, основываясь на анализах сравнения последовательности частей генов L, M, N и F. Основываясь на отличиях в нуклеотидном и аминокислотном составе вирусных нуклеотидных и аминокислотных последовательно-

стей (вирусные последовательности) и по аналогии с другими пневмовирусами, такими как RSV, данные генотипы MPV представляют собой подтипы MPV. В пределах каждого из генетических кластеров изолятов MPV на уровне нуклеотидов обнаружили степень идентичности в размере 94-100% для L, 91-100% для M, 90-100% для N и 93-100% для F, а на уровне аминокислот обнаружили степень идентичности в размере 91-100% для L, 98-100% для M, 96-100% для N и 98-100% для F.

Дополнительное сравнение можно найти на фиг. 18 по 28. Минимальная степень идентичности на уровне нуклеотидов для целой группы изолированного РНК-содержащего вируса с однонитевой антисмысловой РНК, существенно характерного для млекопитающих, как представлено здесь (изоляты MPV) установлена до настоящего времени, составила 81% для L и M, 83% для N и 82% для F. На уровне аминокислот данный процент составил 91 для L и N, 94 для M и 95 для F. Для вирусной последовательности изолята MPV или отдельного гена F у MPV, как представлено здесь, например, показана идентичность с соответствующей нуклеотидной или аминокислотной последовательностью гена слияния (F) у APV-C менее чем 81% последовательности нуклеотидов или менее чем 82% аминокислотной последовательности, например, как представлено у Seal et al., Vir. Res. 66:139-147 (2000).

Также, для вирусной последовательности изолята MPV или отдельного гена L у MPV, как представлено здесь, например, показана идентичность с соответствующей нуклеотидной или аминокислотной последовательностью гена полимеразы у APV-A менее чем 61% нуклеотидной последовательности или менее чем 63% аминокислотной последовательности, например, как представлено у Randhawa et al., J. Gen. Vir. 77:3047-3051 (1996).

Несоответствие последовательности штаммов MPV во всем мире, по аналогии с другими вирусами, может быть несколько выше. Следовательно, два возможных генетических кластера идентифицируют посредством анализов неполных нуклеотидных последовательностей ORF для N, M, F и L 9 вирусных изолятов. В пределах кластера обнаружена идентичность нуклеотидов в размере 90-100%, а между кластерами идентичность составила 81-88%. Информация о последовательности, полученная на большом количестве изолятов, подтвердила существование двух генотипов. Вирусный изолят ned/00/01 как прототип кластера A и вирусный изолят ned/99/01 как прототип кластера B использовали в анализах перекрестной нейтрализации для проверки возможной связи генотипов с различными серотипами или подгруппами. Из данных фактов авторы настоящего изобретения заключили, что вирусные изоляты, существенно характерные для млекопитающих, для которых процент гомологии аминокислот с изолятом I-2614 является более высоким, чем 64 для L, 87 для M, 88 для N, 68 для P, 81 для F, 84 для M2-1 или 58 для M2-2, можно классифицировать как изолированный РНК-содержащий вирус с однонитевой антисмысловой РНК, существенно характерный для млекопитающих, как представлено здесь. В частности, такие вирусные изоляты, которые, в общем, на уровне нуклеотидной последовательности обладают минимальной степенью идентичности с изолятом-прототипом MPV, как представлено здесь, в размере 81% для L и M, 83% для N и/или 82% для F, являются представителями группы изолятов MPV, как представлено здесь. На уровне аминокислот, данный процент составляет 91 для L и N, 94 для M и/или 95 для F. Когда процент гомологии аминокислотной последовательности для данного вирусного изолята выше, чем 90 для L и N, 93 для M или 94 для F, вирусный изолят является похожим на группу изолятов MPV, изображенную на фиг. 5. Когда процент гомологии аминокислотной последовательности для данного вирусного изолята выше, чем 94 для L, 95 для N или 97 для M и F, вирусный изолят можно идентифицировать как принадлежащий к одному из кластеров генотипов, представленных на фиг. 5. Необходимо заметить, что данные проценты гомологии, с помощью которых определены генетические кластеры, похожи на степень гомологии, обнаруженную у генетических кластеров соответствующих генов RSV.

Вкратце, изобретение относится к изолированному РНК-содержащему вирусу с однонитевой антисмысловой РНК, существенно характерному для млекопитающих (MPV), принадлежащему к подсемейству Pneumovirinae семейства Paramyxoviridae и определяемому как филогенетически соответствующий роду *Metapneumovirus*, посредством определения нуклеотидной последовательности подходящего фрагмента генома указанного вируса и проверки ее посредством анализов филогенетического дерева, где строят деревья максимального правдоподобия с применением 100 условий инициализации и 3 перестановок, и находя ее более тесно филогенетически соответствующей вирусному изоляту, депонированному в CNCM, Paris как I-2614, чем соответствующей вирусному изоляту пневмовируса птиц (APV), также известному как вирус ринотрахеита индеек (TRTV), этиологическому возбудителю ринотрахеита птиц.

Подходящими для таких анализов филогенетического дерева фрагментами нуклеиновой кислоты генома, ведущими к различным анализам филогенетического дерева, как показано здесь на фиг. 4 или 5, являются, например, любой из фрагментов 1-10 RAP-PCR, как показано здесь в подробном описании. Анализы филогенетического дерева генов нуклеопротеина (N), фосфопротеина (P), матриксного белка (M) и белка слияния (F) MPV выявили наибольшую степень гомологии последовательности с серотипом С APV, пневмовируса птиц, впервые обнаруженного у птиц в Соединенных Штатах.

В предпочтительном осуществлении, изобретение относится к изолированному РНК-содержащему вирусу с однонитевой антисмысловой РНК, существенно характерному для млекопитающих (MPV), принадлежащему к подсемейству Pneumovirinae семейства Paramyxoviridae и определяемому как филогенетически соответствующий роду *Metapneumovirus*, посредством определения нуклеотидной последовательности

тельности подходящего фрагмента генома указанного вируса и проверки ее посредством анализов филогенетического дерева, где строят деревья максимального правдоподобия с применением 100 условий инициализации и 3 перестановок, и находит ее более тесно филогенетически соответствующей вирусному изоляту, депонированному в CNCM, Paris как I-2614, чем соответствующей вирусному изоляту пневмовируса птиц (APV), также известному как вирус ринотрахеита индеек (TRTV), этиологическому возбудителю ринотрахеита птиц, где указанный подходящий фрагмент содержит открытую рамку считывания, кодирующую вирусный белок указанного вируса.

Подходящая открытая рамка считывания (ORF) содержит ORF, кодирующую белок N. Когда обнаруженная общая идентичность аминокислот анализируемого белка N с белком N изолята I-2614 составляет, по меньшей мере, 91%, предпочтительно по меньшей мере 95%, анализируемый вирусный изолят включает предпочтительный изолят MPV по изобретению. Как показано, первый ген на геномной карте MPV кодирует белок из 394 аминокислот (аа) и обнаруживает большую гомологию с белком N других пневмовирусов. Длина ORF у N идентична длине ORF у N APV-C (табл. 5) и меньше, чем у других парамиксовирусов (Barr et al., 1991). Анализ аминокислотной последовательности выявил высочайшую гомологию с APV-C (88%) и только 7-11% с другими парамиксовирусами (табл. 6).

Barr et al. (1991) идентифицировали 3 области сходства у вирусов, принадлежащих к порядку Mononegavirales: A, B и C (фиг. 8). Хотя сходство наиболее высоко в пределах вирусного семейства, в различных семействах вирусов данные области являются высоко консервативными. Во всех трех областных MPV выявлена идентичность аминокислотной последовательности в размере 97% с APV-C, 89% - с APV-B, 92% - с APV-A и 66-73% - с RSV и PVM. Область между аминокислотными остатками 160 и 340 оказывается высоко консервативной у метапневмовирусов и, несколько в меньшей степени, у Pneumovirinae (Miyahara et al., 1992; Li et al., 1996; Barr et al., 1991). Данная конкретная область, обнаруживающая 99% сходства с APV-C, находится в согласии с тем, что MPV является метапневмовирусом.

Другая подходящая рамка считывания (ORF), пригодная для филогенетических анализов, содержит ORF, кодирующую белок P. Когда обнаруженная общая идентичность аминокислот анализируемого белка P с белком P изолята I-2614 составляет по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере, 85%, анализируемый вирусный изолят включает предпочтительный изолят MPV по изобретению. Вторая ORF на геномной карте кодирует белок из 294 аминокислот, который обладает гомологией аминокислотной последовательности с белком P APV-C в размере 68%, а с белком P RSV - только 22-26% (табл. 6). Ген P MPV содержит одну основную ORF и в данном отношении подобен P многих других парамиксовирусов (Рассмотрено у Lamb and Kolakofsky, 1996; Sedlmeier et al., 1998). В отличие от APV A, B и PVM и подобно RSV и APV-C в ORF для P у MPV отсутствуют остатки цистеина.

Ling (1995) предположил, что область высокого сходства всех пневмовирусов (аминокислотные остатки 185-241) играет роль или в процессе синтеза РНК, или в поддержании структурной целостности нуклеокапсидного комплекса. Данная область высокого сходства, также обнаруженная у MPV (фиг. 9), особенно когда в расчет берут консервативные замены, показывает 100% сходство с APV-C, 93% с APV-A и B и примерно 81% с RSV. С-конец белка P у MPV богат остатками глутамата, как описано для APV-C (Ling et al., 1995).

Другая подходящая рамка считывания (ORF), пригодная для филогенетических анализов, содержит ORF, кодирующую белок M. Когда обнаруженная общая идентичность аминокислот анализируемого белка M с белком M изолята I-2614 составляет по меньшей мере 94%, предпочтительно, по меньшей мере, 97%, анализируемый вирусный изолят включает предпочтительный изолят MPV по изобретению. Третья ORF генома MPV кодирует белок из 254 аминокислот, и похожа на ORF для M других пневмовирусов. ORF для M у MPV обладает точно таким же размером, что и ORF для M других метапневмовирусов (табл. 5), и показывает высокую гомологию аминокислотной последовательности с матриксовым белком APV (76-87%), меньшую гомологию с матриксовым белком RSV и PVM (37-38%) и 10% или меньшую гомологию с матриксовым белком других парамиксовирусов (таблица 6). Easton (1997) сравнил последовательности матриксов белков всех пневмовирусов и обнаружил консервативный гексапептид от остатка 14 до остатка 19, который также консервативен и в MPV (фигура 10). Для RSV, PVM и APV идентифицированы малые вторичные ORF в пределах главной ORF для M или перекрывающиеся с нею (52 аминокислоты и 51 аминокислота у bRSV, 75 аминокислот у RSV, 46 аминокислот у PVM и 51 аминокислота у APV) (Yu et al., 1992; Easton et al., 1997; Samal et al., 1991; Satake et al., 1984). Авторы настоящего изобретения отметили две малые ORF в ORF для M у MPV. Одну малую ORF из 54 аминокислотных остатков обнаружили в пределах главной ORF для M, начиная от 2281 нуклеотида, а другую малую ORF из 33 аминокислотных остатков, перекрывающуюся с главной ORF для M, обнаружили, начиная с нуклеотида 2893 (данные не показаны). Подобно вторичным ORF у RSV и APV, значимой гомологии данных вторичных ORF и ORF других пневмовирусов не обнаружено, а видимые сигналы инициации или терминации отсутствуют. Кроме того, доказательства синтеза белков, соответствующих данным вторичным ORF у APV и RSV, отсутствуют.

Другая подходящая рамка считывания (ORF), пригодная для филогенетических анализов, содержит ORF, кодирующую белок F. Когда обнаруженная общая идентичность аминокислот анализируемого белка F с белком F изолята I-2614 составляет по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере

97%, анализируемый вирусный изолят включает предпочтительный изолят MPV по изобретению. ORF для F у MPV расположена в непосредственной близости от ORF для M, что характерно для представителей рода *Metapneumovirus*. Ген F у MPV кодирует белок из 539 аминокислот, который на два аминокислотных остатка больше, чем F у APV-C (табл. 5). Анализ аминокислотной последовательности показал 81% гомологии с APV-C, 67% с APV-A и B, 33-39% с белками F пневмовирусов и только 10-18% с другими парамиксовирусами (табл. 6). Одним из консервативных признаков у белков F парамиксовирусов, который также наблюдали у MPV, является расположение цистeinовых остатков (Morrison, 1988; Yu et al., 1991). Метапневмовирусы обладают 12 остатками цистеина в F1 (7 являются консервативными у всех парамиксовирусов) и двумя в F2 (1 является консервативным у всех парамиксовирусов). Из 3 возможных участков N-связанного гликозилирования, представленных в ORF для F у MPV, ни один не является общим с RSV и два (позиции 66 и 389) являются общими с APV. Третий, уникальный, участок возможного N-связанного гликозилирования для MPV расположен в позиции 206 (фиг. 11). Несмотря на низкую гомологию последовательности с другими парамиксовирусами, белок F MPV обнаруживает типичные характеристики белка слияния, согласующиеся с характеристиками, описанными для белков F других представителей семейства *Paramyxoviridae* (Morrison, 1988). Белки F представителей *Paramyxoviridae* синтезируются в виде неактивных предшественников (FO), расщепляемых посредством протеаз клетки-хозяина, образующих N-концевые субъединицы F2 и большие C-концевые субъединицы F1. Предполагаемый участок расщепления (Collins et al., 1996) консервативен у всех представителей семейства *Paramyxoviridae*. Участок расщепления у MPV содержит остатки RQSR. Оба аргининовых (R) остатка являются общими с APV и RSV, но глутаминовый (Q) и сериновый (S) остатки являются общими с другими парамиксовирусами, такими как вирус парагриппа человека типа I, вирус Сендей и морбиливирусы (данные не показаны). Полагают, что N-концевая гидрофобная область F1 функционирует как мембранный домен слияния и показывает высокое сходство последовательности у парамиксовирусов и морбиливирусов и, в меньшей степени, у пневмовирусов (Morrison, 1988). Данные 26 остатков (позиции 137-163, фиг. 11) консервативны у MPV и APV-C, что согласуется с тем, что данная область является высоко консервативной у метапневмовирусов (Naylor et al., 1998; Seal et al., 2000).

Как видно для субъединиц F2 у APV и других парамиксовирусов, MPV обнаруживает делецию 22 аминокислотных остатков в сравнении с RSV (позиции 107-128, фигура 11). Более того, для RSV и APV обнаружено, что сигнальный пептид и якорный домен являются консервативными в пределах подтипов и высоко вариабельны между подтипами (Plows et al., 1995; Naylor et al., 1998). Сигнальный пептид MPV (аминокислоты 10-35, фигура 11) на N-конце F2 демонстрирует некоторое сходство с последовательностью APV-C (18 из 26 аминокислотных остатков являются сходными) и меньшую консервативность с другими видами APV или RSV. Гораздо большую вариабельность наблюдают в мембранным якорном домене на карбоксильном конце F1, хотя некоторая гомология с APV-C еще видна.

Другая подходящая открытая рамка считывания (ORF), пригодная для филогенетических анализов, содержит ORF, кодирующую белок M2. Когда обнаруженная общая идентичность аминокислот анализируемого белка M2 с белком M2 изолята I-2614 составляет, по меньшей мере, 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, анализируемый вирусный изолят включает предпочтительный изолят MPV по изобретению. Ген M2 унисален для *Pneumovirinae*, а для всех пневмовирусов наблюдали две перекрывающиеся ORF. Первая главная ORF соответствует белку M2-1, который усиливает процессивность вирусной полимеразы (Collins et al., 1995; Collins, 1996) и прохождение ею межгенных областей (Hardy et al., 1998; Farnes et al., 1999). Ген M2-1 у MPV, расположенный рядом с геном F, кодирует белок из 187 аминокислот (табл. 5), и обнаруживает наивысшую (84%) гомологию с M2-1 у APV-C (табл. 6). Сравнение всех пневмовирусных белков M2-1 выявило наибольшую консервативность N-концевых частей белка (Collins et al., 1990; Zamora et al., 1992; Ahmadian et al., 1999), что согласуется с наблюдением, что MPV обнаруживает 100% сходство с APV-C первых 80 аминокислотных остатков белка (фиг. 12A). Белок M2-1 у MPV содержит 3 цистeinовых остатка, расположенных в пределах первых 30 аминокислотных остатков, что является консервативным у всех пневмовирусов. Такая концентрация цистeinовых остатков часто обнаруживается у связывающих цинк белков (Ahmadian et al., 1991; Cuesta et al., 2000).

Вторичные ORF (M2-2), перекрывающиеся с M2-1 ORF пневмовирусов, являются консервативными по расположению, но не по последовательности, и, как считается, вовлечены в контроль переключения между репликацией вирусной РНК и транскрипцией (Collins et al., 1985; Elango et al., 1985; Baybutt et al., 1987; Collins et al., 1990; Ling et al., 1992; Zamora et al., 1992; Alansari et al., 1994; Ahmadian et al., 1999; Bermingham et al., 1999). У MPV ORF для M2-2 начинается с 512 нуклеотида ORF для M2-1 (фиг. 7), что является точно такой же стартовой позицией, как у APV-C. Длины ORF для M2-2 являются одинаковыми для APV-C и MPV и составляют 71 аминокислотный остаток (табл. 5). Сравнение последовательности ORF для M2-2 (фиг. 12B) выявило 56% гомологию аминокислотных последовательностей у MPV и APV-C и только 26-27% гомологию аминокислотных последовательностей у MPV и APV-A и B (табл. 6).

Другая подходящая открытая рамка считывания (ORF), пригодная для филогенетических анализов, содержит ORF, кодирующую белок L. Когда обнаруженная общая идентичность аминокислот анализируемого белка L с белком L изолята I-2614 составляет по меньшей мере 91%, предпочтительно по меньшей мере 95%, анализируемый вирусный изолят включает предпочтительный изолят MPV по изобрете-

нию. Аналогично другим вирусам с "минус"-цепью, последняя ORF генома MPV является компонентом РНК-зависимой РНК полимеразы комплексов репликации и транскрипции. Ген L у MPV кодирует белок из 2005 аминокислот, который на 1 остаток больше, чем данный белок у APV-A (табл. 5). Белок L у MPV проявляет гомологию по последовательности в размере 64% с APV-A, 42-44% - с RSV и приблизительно 13% с другими парамиксовирусами (табл. 6). Poch et al. (1989; 1990) идентифицировали шесть консервативных доменов в белках L несегментированных РНК-вирусов с "минус"-цепью, из которых домен III включает четыре мотива ядра полимеразы, которые, как считается, являются основными для функционирования полимеразы. Данные мотивы (A, B, C и D) являются в высокой степени консервативным в белке L у MPV: по мотивам A, B и C: MPV обладает 100% сходством со всеми пневмовирусами, а по мотиву D MPV обладает 100% сходством с APV и 92% - с RSV. Для целого домена III (аминокислоты 625-847 в ORF для L) MPV обладает гомологией с APV в размере 83%, с RSV - 67-68% и с другими парамиксовирусами - 26-30% (фиг. 15). В дополнение к мотивам полимеразы, белки L пневмовирусов содержат последовательность, соответствующую консенсусному АТФ-связывающему мотиву K(X)<sub>21</sub>GEGAGN(X)<sub>20</sub>K (Stec, 1991). Подобно APV, ORF для L у MPV содержит мотив, в котором размещение промежуточных остатков сдвинуто на один: K(X)<sub>22</sub>GEGAGN(X)<sub>19</sub>K.

Более предпочтительная подходящая открытая рамка считывания (ORF), пригодная для филогенетических анализов, содержит ORF, кодирующую белок SH. Когда обнаруженная общая идентичность аминокислот анализируемого белка SH с белком SH изолята I-2614 составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, анализируемый вирусный изолят включает предпочтительный изолят MPV по изобретению. Данный ген, располагающийся рядом с M2 у MPV, кодирует белок из 183 аминокислот (фиг. 7). Анализ нуклеотидной последовательности и выведенной из нее аминокислотной последовательности не выявил заметной гомологии с другими генами или продуктами генов РНК-содержащих вирусов. ORF для SH у MPV является длиннейшей ORF для SH, известной до настоящего времени (табл. 5). Состав аминокислотных остатков ORF для SH относительно схож с составом аминокислотных остатков APV, RSV и PVM с высоким процентом треонина и серина (22%, 18%, 19%, 20,0%, 21% и 28% содержания серина/ треонина у MPV, APV, RSV A, RSV B, bRSV and PVM, соответственно). ORF для SH у MPV содержит 10 цистeinовых остатков, тогда как SH у APV содержит 16 цистeinовых остатков. Все пневмовирусы обладают схожими количествами участков возможного N-связанного гликозилирования (у MPV - 2, у APV - 1, у RSV - 2, у bRSV - 3, у PVM - 4).

Профили гидрофобности белков SH у MPV, APV и RSV обнаружили одинаковые структурные особенности (фиг. 13В). ORF для SH у APV и у MPV обладают гидрофильным N-концом (аминокислоты 1-30), центральным гидрофобным доменом (аминокислоты 30-53), который может служить в качестве возможного трансмембранныго домена, вторым гидрофобным доменом вокруг 160 остатка и гидрофильным C-концом. Напротив, в SH у RSV обнаружено отсутствие C-концевой половины ORF у APV и MPV. У всех пневмовирусов гидрофобные домены белков SH фланкируются основными аминокислотами, которые также обнаружены в ORF для SH у MPV (аминокислоты 29 и 54).

Другая более предпочтительная подходящая открытая рамка считывания (ORF), пригодная для филогенетических анализов, содержит ORF, кодирующую белок G. Когда обнаруженная общая идентичность аминокислот анализируемого белка G с белком G изолята I-2614 составляет, по меньшей мере, 30%, предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, анализируемый вирусный изолят включает предпочтительный изолят MPV по изобретению. ORF для G у MPV расположена рядом с геном SH и кодирует белок из 236 аминокислот. Обнаруженная вторичная малая ORF, расположенная непосредственно вслед за данной ORF, потенциально кодирует 68 аминокислотных остатков (позиции 6973-7179), но у нее отсутствует стартовый кодон. Третья большая ORF, в другой рамке считывания, из 194 аминокислотных остатков (фрагмент 4, фиг. 7), перекрывается с обеими из данных ORF, но также не обладает стартовым кодоном (нуклеотиды 6416-7000). Данная большая ORF, следующая за четвертой ORF в той же самой рамке считывания (нуклеотиды 7001-7198), возможно кодирует 65 аминокислотных остатков, но снова не обладает стартовым кодоном. Наконец, в третьей рамке считывания (нуклеотиды 6444-6737, фиг. 1) обнаружена потенциальная ORF из 97 аминокислотных остатков (но не обладающая стартовым кодоном). В отличие от первой ORF, другие ORF не имеют видимых последовательностей начала или конца гена (см. ниже). Хотя 236 аминокислотных остатков ORF для G, вероятно, представляют, по меньшей мере, часть белка прикрепления MPV, нельзя исключить, что дополнительные кодирующие последовательности экспрессируются в виде отдельных белков или как часть белка прикрепления вследствие некоторого события, изменяющего РНК. Следует заметить, что у APV и RSV не идентифицировали вторичных ORF после первичной ORF для G, но и APV и RSV обладают вторичными ORF в пределах главной ORF для G.

Однако доказательство экспрессии этих ORF отсутствует, и не существует гомологии расчетной аминокислотной последовательности у различных вирусов (Ling et al., 1992). Во вторичных ORF для G у MPV не обнаружили особенностей других белков G, а чтобы выяснить экспрессируются ли дополнительные ORF, нужно провести дополнительные исследования. Анализ BLAST со всеми четырьмя ORF не выявил заметной гомологии с другими известными вирусными генами или продуктами генов на уровнях

нуклеотидов или аминокислотной последовательности. Это согласуется с низкими гомологиями последовательности, найденными для других белков G, таких как hRSV A и B (53%) (Johnson et al., 1987) и APV A и B (38%) (Juhasz et al., 1994).

Тогда как большинство ORF у MPV имеют сходство с ORF у APV как по длине, так и по последовательности, ORF для G у MPV значительно меньше, чем ORF для G у APV (табл. 5).

Аминокислотная последовательность обнаруживает содержание серина и треонина в размере 34%, что даже выше, чем 32% у RSV и 24% у APV. ORF для G также содержит 8,5% пролиновых остатков, что выше, чем 8% у RSV и 7% у APV. Необычное изобилие пролиновых остатков в белках G у APV, RSV и MPV также наблюдали у гликопротеинов слизистого происхождения, где они являлись главной детерминантой третичной структуры белков (Collins et al., 1983; Wertz et al., 1985; Jentoft, 1990). Количество потенциальных участков N-связанного гликозилирования в G у MPV является сходным с другими пневмовирусами: у MPV их 5, тогда как у hRSV их 7, у bRSV - 5 и у APV - от 3 до 5.

Предсказанный профиль гидрофобности G у MPV выявил особенности, сходные с другими пневмовирусами. N-концы содержат гидрофильную область, за которой следует короткая гидрофобная зона (аминокислоты 33-53) и преимущественно гидрофильный карбоксильный конец (фиг. 14B). Такая общая организация согласуется с организацией заякоренных трансмембранных белков II типа и хорошо соответствует данным областям белков G у APV и RSV. ORF для G у MPV содержит только 1 цистeinовый остаток, в отличие от RSV и APV (5 и 20 соответственно).

По классическому серологическому анализу, например, как известно из Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., and Brown, F., *Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1991. Supplement 2: p. 140-144*, изолят MPV также идентифицируют как принадлежащий к серотипу, как представлено здесь, определенному на основании своих иммунологических отличий, что устанавливали посредством количественной нейтрализации с антисыворотками животных (полученными, например, от хорьков или морских свинок, как представлено в подобном описании). Такой серотип или перекрестно не реагировал с другими, или показывал соотношение титра гомологичного к гетерологичному  $>16$  в обоих направлениях. Если нейтрализация выявляет некоторую степень перекрестной реакции двух вирусов в одном из двух или в обоих направлениях (соотношение титра гомологичного к гетерологичному восемь или 16), отличия серотипов принимают при наличии существенных биофизических/биохимических отличий ДНК. Если нейтрализация выявляет отчетливую перекрестную реакцию двух вирусов в одном из двух или в обоих направлениях (соотношение титра гомологичного к гетерологичному меньше, чем восемь), полагают, что изучаемые серотипы изолятов идентичны. Как указано выше, здесь представлен подходящий изолят-прототип, такой как изолят I-2614, также известный здесь как изолят MPV 00-1.

Дальнейшую классификацию вируса в качестве изолированного РНК-содержащего вируса с одннитевой антисмысловой РНК, существенно характерного для млекопитающих, как представлено здесь, можно проводить на основании гомологии белков G и/или SH. В тех случаях, когда общая идентичность аминокислотной последовательности ORF для N, P, M, F, M2 и L у APV (выделенного у птиц) и у MPV (выделенного у людей) составляла от 64 до 88 процентов, а также обнаружена гомология нуклеотидных последовательностей некодирующих областей геномов APV и MPV, по существу не обнаружили видимой гомологии аминокислотной последовательности двух ORF изолята человека (MPV) и любой из ORF других парамиксовирусов. Содержание аминокислот, профили гидрофобности и расположение данных ORF в вирусном геноме показали, что они представляют аналоги белков G и SH. Гомология последовательности у APV и MPV, сходная организация их геномов (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'), а также филогенетический анализ представляют дополнительное доказательство для предложенной классификации MPV как первого метапневмовируса млекопитающих. Таким образом, например, новые изоляты MPV идентифицировали как таковые посредством выделения вируса из tMK или других клеток и характеристики посредством RT-PCR и/или анализа последовательности, с последующими анализами филогенетического дерева, а также посредством серологических способов, таких как анализы вирусной нейтрализации, непрямые иммунофлуоресцентные анализы, прямые иммунофлуоресцентные анализы, анализы FAC или другие иммунологические способы. Предпочтительно эти способы нацелены на аналоги белков SH и/или G.

Например, изобретение представляет здесь способ для идентификации дополнительных изолятов MPV, как представлено здесь, причем способ включает инокуляцию по существу не инфицированным MPV или не несущим конкретный патогенный микроорганизм морским свинкам или хорькам (в подробном описании животное инокулируют интраназально, но также допустимы и другие пути инокуляции, такие, как внутримышечная или подкожная инокуляция, а также использование другого экспериментального животного) изолята-прототипа I-2614 или родственных изолятов. Сыворотки отбирают у животного на нулевые сутки, через две и три недели после инокуляции. У животного проходила специфичная сероконверсия, что измеряли посредством анализа нейтрализации вируса (VN) и непрямым IFA против соответствующего изолята I-2614, а сыворотки животного с сероконверсией применяли для иммунологического выявления указанных дополнительных изолятов.

Как пример, изобретение относится к характеристике нового представителя семейства Paramyxoviridae, метапневмовируса человека или метапневмовирусподобного вируса (так как его окончательная таксономия ожидает дискуссии в Комитете по таксономии вирусов, здесь MPV описан, например, как таксономически соответствующий APV) (MPV), способный вызывать тяжелое заболевание дыхательных путей у людей. Клинические признаки заболевания, вызываемого MPV, такие как кашель, миалгия, рвота, лихорадка, бронхиолит или пневмония, возможный конъюнктивит или их комбинации, по существу сходны с клиническими признаками, вызываемыми hRSV. Как видно у инфицированных hRSV детей, очень маленькие дети могут нуждаться в госпитализации. Как пример, здесь представлен MPV, депонированный 19 января 2001 года как I-2614 в CNCM, Institute Pasteur, Paris или вирусный изолят, филогенетически соответствующий ему. Кроме того, изобретение относится к вирусу, содержащему нуклеиновую кислоту или функциональному фрагменту, филогенетически соответствующему последовательности нуклеиновой кислоты, показанной на фиг. 6а, 6б, 6с, или структурно соответствующему ей. Конкретно, изобретение относится к вирусу, характеризующемуся тем, что после его проверки посредством филогенетических анализов, при которых строят деревья максимального правдоподобия с применением 100 условий инициализации и 3 перестановок, его признали более близко филогенетически соответствующим вирусному изоляту, депонированному в CNCM, Paris как I-2614, чем соответствующим вирусному изоляту пневмовируса птиц (APV), также известному как вирус ринотрахеита индеек (TRTV), этиологическому возбудителю ринотрахеита птиц. Особенно применимым является использование вирусного изолята APV-C, представляющего собой наиболее близкородственный, хотя и существенно не характерный для млекопитающих вирус в качестве внешней группы для указанных анализов филогенетического дерева.

Авторы настоящего изобретения представляют новый вирус человека, который следует называть метапневмовирусом человека или метапневмовирусподобным вирусом (MPV), основываясь на нескольких наблюдениях. Анализ EM выявил парамиксовирусподобные частицы. Согласно классификации, MPV чувствителен к обработке хлороформом. MPV оптимально культивировать в клетках tMK, и он зависит от трипсина. Клинические симптомы, вызываемые посредством MPV, а также типичный СРЕ и отсутствие гемагглютинирующей активности означают, что данный вирус является близкородственным с hRSV. Хотя большинство парамиксовирусов обладают гемагглютинирующей активностью, большинство пневмовирусов ею не обладают<sup>18</sup>.

Как пример, изобретение относится к ранее не идентифицированному парамиксовирусу из образцов назофарингеального аспираата, забранного у 28 детей, страдающих тяжелым RTI. Клинические симптомы у данных детей являлись очень сходными с симптомами, вызываемыми hRSV. Двадцать семь пациентов являлись детьми в возрасте до пяти лет, а половина из них в возрасте от 1 до 12 месяцев. Другой пациент находился в возрасте 18 лет. Все субъекты страдали заболеванием верхних дыхательных путей, с симптомами, колеблющимися от кашля, миалгии, рвоты и лихорадки до бронхиолита и тяжелой пневмонии. Большинство данных пациентов подвергали госпитализации от одной до двух недель.

Вирусные изоляты от этих пациентов при негативной контрастной электронной микроскопии обладали морфологией парамиксовирусов, но не реагировали со специфичными антисыворотками против известных парамиксовирусов человека и животных. Как определили посредством непрямых иммунофлюоресцентных анализов (IFA) с сыворотками, активированными против двух из изолятов, все они оказались близкородственными друг другу. Анализы последовательности девяти из данных изолятов выявили, что вирус до некоторой степени родственен APV. Основываясь на вирусологических данных, гомологии последовательности, а также геномной организации, авторы настоящего изобретения предполагают, что вирус является представителем рода *Metapneumovirus*. Серологические исследования показали, что данный вирус является относительно обычным патогенным микроорганизмом, так как доминирование серотипа в Голландии у людей в возрасте около пяти лет приближается к 100%. Более того, обнаружено, что доминирование серотипа в сыворотках, собранных у людей в 1958 году, является в равной степени высоким, указывая на то, что данный вирус циркулировал в популяции людей более чем 40 лет. Идентификация данного предполагаемого нового представителя рода *Metapneumovirus* теперь также обеспечивает развитие средств и способов для диагностических анализов, или тестовых наборов и вакцин, или композиций сывороток, или антител для вирусных инфекций дыхательных путей, и способы для проверки или скрининга противовирусных агентов, пригодных для лечения инфекций MPV.

До этой степени изобретение среди прочего относится к изолированной или рекомбинантной нуклеиновой кислоте, или ее функциональному фрагменту, специфичному для вируса, полученным из вируса по изобретению. В частности, изобретение относится к праймерам и/или зондам, пригодным для определения нуклеиновой кислоты MPV. Кроме того, изобретение относится к вектору, включающему нуклеиновую кислоту по изобретению. Прежде всего, представлены векторы, такие как плазмидные векторы, содержащие геном MPV (или его часть), вирусные векторы, содержащие геном MPV (или его часть), (например, но без ограничения, другие парамиксовирусы, вирус коровьей оспы, ретровирусы, бакуловирусы) или MPV, содержащий геном другого вируса (или его часть) или других патогенных микроорганизмов. Кроме того, описан ряд способов обратной генетики для получения рекомбинантных вирусов с "минус"-цепью, основываясь на двух критических параметрах. Во-первых, получение таких ви-

русов зависит от репликации неполной или полноразмерной копии антисмысловой вирусной геномной РНК (вРНК) или ее комплементарной копии (кРНК). Данную вРНК или кРНК можно выделить из вызывающего инфекцию вируса, получить путем транскрипции *in vitro* или из клеток путем трансфекции нуклеиновых кислот. Во-вторых, получение рекомбинантного вируса с "минус"-цепью зависит от функционального полимеразного комплекса. Обычно, полимеразный комплекс пневмовирусов состоит из белков N, P, L и возможно M2, но не обязательно ограничивается ими. Полимеразные комплексы или их компоненты можно получить из вирусных частиц, выделенных из клеток, экспрессирующих один или несколько компонентов, или получить посредством трансфекции специфичных экспрессирующих векторов.

Инфекционные копии MPV можно получить, когда вышеуказанный полимеразный комплекс реплицирует вышеуказанные вРНК, кРНК или векторы, экспрессирующие данные РНК<sup>16,17,18,19,20,21,22</sup>. Для получения минирапликонов или системы обратной генетики для получения полноразмерной копии, содержащей большую часть генома MPV или весь геном достаточно применить 3'-концевые и/или 5'-концевые последовательности нуклеиновой кислоты, например, полученные из APV или самого MPV (Randhawa et al., 1997).

Также изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению. Плазмидные или вирусные векторы, включающие компоненты полимеразы MPV (предположительно N, P, L и M2, но не обязательно ограничивающиеся ими), получают из прокариотических клеток для экспрессии компонентов в подходящих клеточных типах (бактерии, клетки насекомых, эукариотические клетки). Для экспрессии вирусных нуклеиновых кислот *in vitro* и *in vivo* в прокариотических клетках должны быть получены плазмидные или вирусные векторы, содержащие полноразмерные или неполные копии генома MPV. Поздние векторы могут содержать другие вирусные последовательности для получения химерных вирусов или химерных вирусных белков, могут не содержать части вирусного генома для получения дефектного по репликации вируса и могут содержать мутации, делеции или инсерции для получения аттенуированных вирусов.

Инфекционные копии MPV (являющиеся диким типом, аттенуированными, дефективными по репликации или химерными) можно получить посредством коэкспрессии компонентов полимеразы по установленным в данной области способам, описанным выше. Кроме того, можно использовать эукариотические клетки, временно или стабильно экспрессирующие один или несколько полноразмерных или неполных белков MPV. Такие клетки можно получить путем трансфекции (белки или векторы из нуклеиновой кислоты), инфекции (вирусные векторы) или трансдукции (вирусные векторы), и они могут являться пригодными для комплементации указанных вирусов дикого типа, аттенуированных, дефективных по репликации или химерных вирусов.

В частности, химерный вирус можно применять для получения рекомбинантных вакцин, защищающих от двух или более вирусов<sup>23,24,26</sup>. Например, можно предусмотреть, чтобы вирусный вектор MPV, экспрессирующий один или более белков RSV или вектор RSV, экспрессирующий один или более белков MPV, защищали вакцинированных таким вектором субъектов от обеих вирусных инфекций. Подобный подход можно предусмотреть для РИ3 или других парамиксовирусов. Аттенуированные и дефектные по репликации вирусы можно применять для целей вакцинации живыми вакцинами, как предлагаются для других вирусов<sup>25,26</sup>.

В предпочтительном осуществлении, изобретение относится к белковой молекуле или белку, специальному для метапневмовируса, или их функциональным фрагментам, кодируемым нуклеиновой кислотой по изобретению. Пригодные белковые молекулы, например, получают из любых генных или геномных фрагментов, получаемых из вируса по изобретению. Такие молекулы или их антигенные фрагменты, как представлено здесь, например, пригодны для диагностических способов или наборов и в фармацевтических композициях, таких как субъединичные вакцины. Особенно применимыми являются белки F, SH и/или G или их антигенные фрагменты для включения как антиген или субъединичный иммуноген, но также можно применять целый инактивированный вирус. Особенno применимыми также являются такие белковые субстанции, которые кодируются фрагментами рекомбинантных нуклеиновых кислот, определенных для филогенетических анализов, конечно предпочтительными являются те из них, которые лежат в предпочтительных пределах и границах ORF, пригодных для филогенетических анализов, в частности для выявления специфичных к MPV антител, или *in vivo* (например, антител для целей защиты или для обеспечения диагностики) или *in vitro* (например, для способа фагового дисплея или другого способа, применимого для получения синтетических антител).

Также здесь представляют антитела, являющиеся природными поликлональными или моноклональными или синтетическими антителами (например, связывающая молекула, полученная из (фаговой) библиотеки), специфически взаимодействующими с антигеном, содержащим белковую молекулу по изобретению или ее функциональный фрагмент, специфичный для MPV. Такие антитела пригодны в способе для идентификации вирусного изолята как содержащего MPV, посредством взаимодействия указанного вирусного изолята или его компонента с антителом, как представлено здесь. Например, данной цели можно достичь посредством использования очищенного или неочищенного MPV или его частей (белков, пептидов), применения ELISA, RIA, FACS или сходные форматы анализов определения антигена (Current Protocols in Immunology). Альтернативно, для идентификации вирусных антигенов можно использо-

вать инфицированные клетки или клеточные культуры, применяя классические иммунофлуоресцентный или иммуногистохимический способы.

Другим способом для идентификации вирусного изолята как содержащего MPV, является взаимодействие указанного вирусного изолята или его компонента со специфичной для вируса нуклеиновой кислотой по изобретению, в частности, когда указанный вирус млекопитающих содержит вирус человека.

Таким образом, изобретение относится к вирусному изоляту, идентифицируемому способом по изобретению как вирус млекопитающих, таксономически соответствующий РНК-содержащему вирусу с одннитевой антисмысловой РНК, идентифицируемому как возможно принадлежащий к роду *Metapneumovirus* подсемейства *Pneumovirinae* семейства *Paramyxoviridae*.

Способ пригоден для способа вирусологической диагностики инфекции MPV млекопитающих, например, указанный способ включает определение присутствия вирусного изолята или его компонента в образце от указанного млекопитающего посредством взаимодействия указанного образца с нуклеиновой кислотой или антителом по изобретению. Далее, в подробном описании, приведены примеры, такие как использование PCR (или других способов амплификации или гибридизации, общеизвестных в данной области) или использование иммунофлуоресцентной детекции (или других иммунологических способов, известных в данной области).

Также изобретение относится к способу для серологической диагностики инфекции MPV млекопитающих, например, указанный способ включает определение присутствия антитела, специфически направленного против MPV, или его компонента в образце от указанного млекопитающего посредством взаимодействия указанного образца с белковой молекулой или ее фрагментом или антигеном по изобретению.

Представленные здесь способы и средства особенно применимы в диагностических наборах для диагностики инфекции MPV, проводимой посредством вирусологической или серологической диагностики. Например, такие наборы или анализы могут включать вирус, нуклеиновую кислоту, белковую молекулу или ее фрагмент, антиген и/или антитело по изобретению. Применения вируса, нуклеиновой кислоты, белковой молекулы или ее фрагмента, антигена и/или антитела по изобретению относятся также к получению фармацевтической композиции, например, к лечению или предотвращению инфекции MPV и/или к лечению или предотвращению заболеваний дыхательных путей, в частности у людей. Аттенуации вируса можно достигнуть посредством установленных способов, разработанных для данной цели, включая применение родственных вирусов других видов, серийных пассажей в лабораторных животных и/или тканевые/клеточные культуры, сайт-направленного мутагенеза молекулярных клонов и обмена генов или генных фрагментов между родственными вирусами, но не ограничиваясь этим.

Фармацевтические композиции, включающие вирус, нуклеиновую кислоту, белковую молекулу или ее фрагмент, антиген и/или антитело по изобретению, например, можно применять в способе лечения или предотвращения инфекций MPV и/или респираторных заболеваний, включающем представление субъекту фармацевтической композиции по изобретению. Именно это наиболее полезно, когда указанный субъект является человеком, особенно когда указанный человек находится в возрасте меньше 5 лет, так как такие младенцы и очень маленькие дети с наибольшей вероятностью подвергаются инфицированию MPV человека, как представлено здесь. Обычно, в острой фазе пациенты должны страдать от симптомов заболевания верхних дыхательных путей, предрасполагающих к другим респираторным и прочим заболеваниям. Также могут возникать заболевания нижних дыхательных путей, предрасполагающие к дополнительным и прочим серьезным состояниям.

Также изобретение относится к способу получения противовирусного средства, пригодного для лечения заболевания дыхательных путей, включающему создание клеточной культуры или экспериментального животного, включающих вирус по изобретению, обработку указанной культуры или животного кандидатом на противовирусное средство и определение эффекта указанного средства на указанный вирус или инфицирование им указанной культуры или животного. Пример такого противовирусного средства включает антитело, нейтрализующее MPV, или его функциональный компонент, как представлено здесь, но также получены противовирусные средства другой природы. Также изобретение относится к применению противовирусного средства по изобретению для получения фармацевтической композиции, в частности, для получения фармацевтической композиции для лечения заболевания дыхательных путей, особенно при инфекции MPV, а также относится к фармацевтической композиции, включающей антивирусное средство по изобретению, применимое в способе лечения или предотвращения инфекции MPV или респираторного заболевания, указанный способ включает представление субъекту такой фармацевтической композиции.

Далее изобретение раскрывают в подробном описании без его ограничений.

#### Пояснения к рисункам

Фиг. 1А содержит табл. 1: процент гомологии, обнаруженной у аминокислотных последовательностей изолята 00-1 и других представителей *Pneumovirinae*. Проценты (x100) даны для последовательностей аминокислот N, P, M, F и двух фрагментов RAP-PCR из L (8 и 9/10). Номера доступа, применяемые для анализов, описываются в разделе "Материалы и методы".

Фиг. 1В содержит табл. 2: доминирование серотипа MPV у людей, распределенных по возрастным группам, с использованием иммунофлуоресцентного анализа и анализа нейтрализации вируса.

Фиг. 2: схематическое представление генома APV с расположением и размером фрагментов, полученных посредством RAP-PCR и RT-PCR из вирусного изолята 00-1. Фрагменты с 1 по 10 получали с применением RAP-PCR. Фрагмент А получали с праймером, подобранным во фрагментах 1 и 2, полученных посредством RAP-PCR, и праймером, подобранным на основе выравнивания лидерной и концевой последовательностей у APV и RSV<sup>6</sup>. Фрагмент В получали с применением праймеров, подобранных во фрагментах 1 и 2, полученных посредством RAP-PCR и во фрагменте 3, полученном посредством RAP-PCR. Фрагмент С получали с применением праймеров, подобранных во фрагменте 3, полученном посредством RAP-PCR и во фрагментах 4, 5, 6 и 7, полученных посредством RAP-PCR.

Для всех филогенетических деревьев (фиг. 3-5) последовательности ДНК выравнивали с применением программного пакета Clustal W, и деревья максимального правдоподобия получали с применением программного пакета DNA-ML программы Phylip 3.5, использующей 100 условий инициализации и 3 перестановки<sup>15</sup>. Ранее опубликованные последовательности, применяемые для получения филогенетических деревьев, доступны в Genbank под номерами доступа: для всех ORF: hRSV: NC001781; bRSV: NC001989; для ORF для F: PVM, D11128; APV-A, D00850; APV-B, Y14292; APV-C, AF187152; для ORF для N: PVM, D10331; APV-A, U39295; APV-B, U39296; APV-C, AF176590; для ORF для M: PVM, U66893; APV-A, X58639; APV-B, U37586; APV-C, AF262571; для ORF для Р: PVM, 09649; APV-A, U22110, APV-C, AF176591. Филогенетические анализы для девяти различных вирусных изолятов MPV проводили со штаммом APV С в качестве внешней группы.

Аббревиатуры, применяемые на фигурах: hRSV: человеческий RSV; bRSV: бычий RSV; PVM: вирус пневмонии мышей; APV-А, В и С: птичий пневмовирус типов А, В и С.

Фиг. 3: сравнение ORF для N, Р, M и F у представителей подсемейства Pneumovirinae и вирусного изолята 00-1. Выравнивание выявило аминокислотные последовательности полных белков N, Р, M и F и неполных белков L вирусного изолята 00-1. Показаны аминокислоты, отличающиеся у изолята 00-1 и других вирусов, идентичные аминокислоты изображали точками, разрывы изображали в виде штрихов. Числа соответствуют позициям аминокислот в белке. Номера доступа, используемые в анализах, описаны в разделе "Материалы и методы". APV-А, В или С: Птичий пневмовирус типа А, В или С, b- или hRSV: бычий или респираторно-синцитиальный вирус человека, PVM: вирус пневмонии мышей. L8: фрагмент 8, полученный посредством RAP-PCR, расположенный в L, L9/10: консенсусный фрагмент 9 и 10, полученный посредством RAP-PCR, расположенный в L. Для выравнивания Р, последовательности APV-B в GenBank недоступны. Для выравнивания L являлись доступными только последовательности bRSV, hRSV и APV-А.

Фиг. 4: филогенетические анализы ORF для N, Р, M и F представителей рода Pneumovirinae и вирусного изолята 00-1. Филогенетический анализ проводили на вирусных последовательностях следующих генов: F (панель А), N (панель В), M (панель С) и Р (панель D). Филогенетические деревья базировались на анализах максимального правдоподобия, использующих 100 условий инициализации и 3 перестановки. Для каждого дерева показана шкала, представляющая количество нуклеотидных замен.

Фиг. 5: филогенетическая родство частей ORF для F (панель А), N (панель В), M (панель С) и L (панель D) девяти первичных изолятов MPV с APV-C, являющимся ближайшим генетическим родственником. Филогенетические деревья базировались на анализах максимального правдоподобия. Для каждого дерева показана шкала, представляющая количество нуклеотидных замен. Номера доступа для APV-C: панель А: D00850; панель В: U39295; панель С: X58639; и панель D: U65312.

Фиг. 6А: информация о нуклеотидной и аминокислотной последовательности 3'-конца генома изолята 00-1 MPV. ORF приведены. N: ORF нуклеопротеина; Р: ORF фосфопротеина; M: ORF матриксного белка; F: ORF белка слияния; GE: конец гена; GS: начало гена.

Фиг. 6В и С: информация о нуклеотидной и аминокислотной последовательности из полученных фрагментов гена полимеразы (L) изолятов 00-1 MPV. Позиционирование фрагментов L основывается на гомологии белков с APV-C (номер доступа U65312). Транслируемый фрагмент 8 (фиг. 6В) располагается, начиная с 8 аминокислоты по 243, а консенсусные фрагменты 9 и 10 (фиг. 6С) располагались в ORF для L у APV-C, начиная с 1358 аминокислоты по 1464.

Фиг. 7: геномная карта изолята 00-1 MPV. Позиции нуклеотидов стартового и терминирующего кодонов показаны под каждой ORF. Двойные линии, которые пересекают ORF для L, показывают более краткое представление гена L. Три рамки считывания ниже карты обозначают основную ORF для G (нуклеотиды 6262-6972) и перекрывающиеся возможные вторичные ORF.

Фиг. 8: выравнивание предсказанной аминокислотной последовательности нуклеопротеина MPV с аминокислотными последовательностями нуклеопротеина других пневмовирусов. Консервативные области, идентифицированные Barr (1991), обводили рамками и помечали А, В и С. Консервативная область пневмовирусов (Li, 1996) затенена серым. Разрывы изображали в виде штрихов, точки указывают положения идентичных аминокислотных остатков, в сравнении с MPV.

Фиг. 9: сравнение аминокислотной последовательности фосфопротеина MPV с аминокислотными последовательностями фосфопротеина других пневмовирусов. Область высокого сходства (Ling, 1995)

обведена рамкой, а область, богатая глутаматом, затенена серым. Разрывы изображали в виде штрихов, точки указывают положения идентичных аминокислотных остатков, в сравнении с MPV.

Фиг. 10: сравнение выведенной аминокислотной последовательности матриксного белка MPV с аминокислотными последовательностями матриксного белка других пневмовирусов. Консервативная гексапептидная последовательность (Easton, 1997) затенена серым. Разрывы изображали в виде штрихов, точки указывают положения идентичных аминокислотных остатков, в сравнении с MPV.

Фиг. 11: выравнивание предсказанной аминокислотной последовательности белка слияния MPV с аминокислотными последовательностями белка слияния других пневмовирусов. Консервативные цистеиновые остатки обведены рамкой, участки N-связанного гликозилирования подчеркнуты, участок расщепления F0 подчеркнут двойной линией, белок слияния, сигнальный белок и мембранный якорный домен показаны серой штриховкой. Разрывы изображали в виде штрихов, точки указывают положения идентичных аминокислот, в сравнении с MPV.

Фиг. 12: сравнение аминокислотной последовательности ORF для M2 у MPV с аминокислотными последовательностями ORF для M2 других пневмовирусов. Выравнивание ORF для M2-1 показано на панели А, с консервативными N-концами (Collins, 1990; Zamora, 1999) затененными серым. Три консервативных цистеиновых остатка напечатаны жирной гарнитурой шрифта и отмечены посредством #. Выравнивание ORF для M2-2 показано на панели В. Разрывы изображали в виде штрихов, точки указывают положения идентичных аминокислот, в сравнении с MPV.

Фиг. 13: анализы аминокислотной последовательности ORF для SH у MPV. (А) Аминокислотная последовательность ORF для SH у MPV, с сериновыми и треониновыми остатками, затененными серым, цистеиновые остатки выделены жирной гарнитурой шрифта, а гидрофобные области подчеркнуты двойной линией. Потенциальные участки N-связанного гликозилирования подчеркнуты одной линией. Числа обозначают положение основных аминокислот, фланкирующих гидрофобный домен. (В) Выравнивание графиков гидрофобности белков SH у MPV, APV-A и hRSV-B. Применили способ Kyte и Doolittle (1982) с окном из 17 аминокислот. Стрелка обозначает сильно гидрофобный домен. Позиции в ORF указаны на оси X.

Фиг. 14: анализы аминокислотной последовательности ORF для G у MPV. (А) Аминокислотная последовательность ORF для G у MPV, с сериновыми, треониновыми и пролиновыми остатками, затененными серым, цистеиновые остатки выделены жирной гарнитурой шрифта, а гидрофобные области подчеркнуты двойной линией. Потенциальные участки W-связанного гликозилирования подчеркнуты одной линией. (В) Выравнивание графиков гидрофобных белков G у MPV, APV-A и hRSV-B. Применили способ Kyte и Doolittle (1982) с окном из 17 аминокислот. Стрелка обозначает сильно гидрофобную область, а позиции в ORF указаны на оси X.

Фиг. 15: сравнение аминокислотных последовательностей консервативного домена гена полимеразы MPV и других парамиксовирусов. Домен III, показанный с четырьмя консервативными мотивами полимеразы (А, В, С, Д) в домене III (Poch 1998, 1999), обведен рамкой.

Разрывы изображали в виде штрихов, точки указывают положения идентичных аминокислотных остатков, в сравнении с MPV. hPIV3: вирус парагриппа человека типа 3; SV: вирус Сендай; hPIV-2: вирус парагриппа человека типа 2; NDV: вирус болезни Ньюкасла; MV: вирус кори; pirah: вирус Nipah.

Фиг. 16: филогенетические анализы ORF для M2-1 и L у MPV и выбранных парамиксовирусов. ORF для M2-1 выравнивали с ORF для M2-1 других представителей рода Pneumovirinae (А), а ORF для L выравнивали с ORF для L представителей рода Pneumovirinae и другими выбранными парамиксовирусами как описано в пояснениях к фиг. 15 (В). Филогенетические деревья получали посредством анализов максимального правдоподобия, использующими 100 условий инициализации и 3 перестановки. Для каждого дерева показана шкала, представляющая количество нуклеотидных замен. Числа в деревьях представляют значения условий инициализации, основанные на консенсусных деревьях.

Фиг. 17: некодирующие последовательности изолята 00-1 hMPV. (А) Некодирующие последовательности между ORF и концами генома показаны в положительной цепи. Слева направо: показаны терминирующие кодоны указанных ORF, с последующими некодирующими последовательностями, сигналами старта гена и стартовые кодоны последующих указанных ORF. Числа указывают первую позицию стартового и терминирующего кодонов на карте hMPV. Последовательности, продемонстрировавшие сходство с опубликованными сигналами конца гена, подчеркнуты, а последовательности, продемонстрировавшие сходство с UAAAAAU/A/C, обозначены линией над последовательностью. (В) Нуклеотидные последовательности концов генома hMPV. Концы генома hMPV выравнивали друг с другом и с концами генома APV. Подчеркнутые области изображают последовательности праймеров, применяемых в анализа RT-PCR, основанные на 3'- и 5'-концевых последовательностях APV и RSV (Randhawa et al., 1997; Mink et al., 1991). Нуклеотиды, выделенные жирным курсивом, являются частью сигнала начала гена N гена. Le: лидерный, Tr: концевой.

Фиг. 18: сравнение двух изолятов-прототипов hMPV с APV-A и APV-C; матрица подобия ДНК для нуклеиновых кислот, кодирующих различные вирусные белки.

Фиг. 19: сравнение двух изолятов-прототипов hMPV с APV-A и APV-C; матрица подобия белка для различных вирусных белков.

Фиг. 20: выравнивание аминокислот нуклеопротеина двух изолятов-прототипов hMPV.

Фиг. 21: выравнивание аминокислот фосфопротеина двух изолятов-прототипов hMPV.

Фиг 22: выравнивание аминокислот матриксного белка двух изолятов-прототипов hMPV.

Фиг. 23: выравнивание аминокислот белка слияния двух изолятов-прототипов hMPV.

Фиг. 24: выравнивание аминокислот белка M2-1 двух изолятов-прототипов hMPV.

Фиг. 25: выравнивание аминокислот белка M2-2 двух изолятов-прототипов hMPV.

Фиг. 26: выравнивание аминокислот короткого гидрофобного белка двух изолятов-прототипов hMPV.

Фиг. 27: выравнивание аминокислот гликопротеина прикрепления двух изолятов-прототипов hMPV.

Фиг. 28: выравнивание аминокислот белка N-конца полимеразы двух изолятов-прототипов hMPV.

Фиг. 29: результаты RT-PCR анализа мазков из гортани и носа 12 морских свинок, инокулированных ned/00/01 и/или ned/99/01.

Фиг. 30А: ответ посредством IgG против ned/00/01 и ned/99/01 у морских свинок, инфицированных ned/00/01 и повторно инфицированных ned/00/01 (GP 4,5 и 6) или ned/99/01 (GP 1 и 3).

Фиг. 30В: ответ посредством IgG против ned/00/01 и ned/99/01 у морских свинок, инфицированных ned/99/01 и повторно инфицированных или ned/00/01 (GP 8 и 9), или ned/99/01 (GP 10, 11, 12).

Фиг. 31: специфичность ELISA с ned/00/01 и ned/99/01 к сывороткам, взятым от морских свинок, инфицированных или ned/00/01, или ned/99/01.

Фиг. 32: средний ответ IgG против ned/00/01 и ned/99/01 посредством ELISA 3 гомологично (00-1/00-1), 2 гомологично (99-1/99-1), 2 гетерологично (99-1/00-1) и 2 гетерологично (00-1/99-1) инфицированных морских свинок.

Фиг. 33: средний процент ингибирования APV у инфицированных hMPV морских свинок.

Фиг. 34: титры нейтрализации вируса у морских свинок, инфицированных ned/00/01 и ned/99/01, против ned/00/01, ned/99/01 и APV-C.

Фиг. 35: Результаты анализов RT-PCR мазков из гортани макаков-крабоедов, (дважды) инокуированных ned/00/01.

Фиг. 36А (две верхние панели): Ответ IgA, IgM и IgG против ned/00/01 у 2 макаков-крабоедов, повторно инфицированных ned/00/01.

Фиг. 36В (нижние панели) Ответ IgG против APV у 2 макаков-крабоедов, инфицированных ned/00/01.

Фиг. 37: сравнение применения ELISA с hMPV и ELISA ингибирования APV для определения антител IgG в сыворотках человека.

#### Подробное описание

##### Выделение и характеристика вируса

С 1980 по 2000 г. авторы настоящего изобретения обнаружили 28 неидентифицированных вирусных изолятов у пациентов с тяжелым респираторным заболеванием. Данные 28 неидентифицированных вирусных изолятов медленно росли в клетках tMK, плохо - в клетках VERO и A549, и не размножались или размножались плохо в клетках MDCK или эмбриональных фибробластах цыплят. Большинство данных вирусных изолятов индуцировали CPE после трех пассажей в клетках tMK, между десятыми и четырнадцатыми сутками. CPE в клетках tMK или других клеточных культурах являлся практически неотличимым от CPE, вызванного hRSV или hPIV и характеризовался образованием синцития, после чего клетки демонстрировали быстрое внутреннее разрушение с последующим их отделением от монослоя. Обычно (иногда позднее) CPE в клетках проявлялся после трех пассажей вируса из оригинального материала с 10 по 14 сутки после инокуляции, немного позднее, чем CPE, вызванный другими вирусами, такими как hRSV или hPIV.

Авторы настоящего изобретения использовали супернатанты инфицированных клеток tMK для анализа EM, который выявил присутствие вирусных частиц, подобных парамиксовирусам, в диапазоне от 150 до 600 нанометров с резкими проекциями оболочек в диапазоне от 13 до 17 нанометров. В соответствии с биохимическими свойствами оболочечных вирусов, таких как Paramyxoviridae стандартная обработка хлороформом или простым эфиром<sup>8</sup> приводила к уменьшению инфекционности для клеток tMK до  $>10^4$  TCID50. Для супернатантов инфицированной вирусом культуры клеток tMK не показана гемагглютинирующая активность с эритроцитами индейки, цыплят или морских свинок. Во время культивирования на тестируемых клетках, репликация вируса казалась зависящей от трипсина. Данные комбинированные вирусологические факты представили возможность таксономически классифицировать вновь идентифицированный вирус как представитель семейства Paramyxoviridae.

Авторы настоящего изобретения выделили РНК из клеток tMK, инфицированных 15 неидентифицированными вирусными изолятами, для анализов для обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (RT-PCR), применяющих наборы праймеров, специфичные для Pneumovirinae<sup>9</sup>, hPIV 1-4, вируса Сендей, вируса обезьяньего типа 5, вируса болезни Ньюкасла, вирусов hRSV, кори, Nipah, Hendra, Tupaia и Maruera. Анализы RT-PCR проводили в мягких условиях для того, чтобы обнаружить возможные родственные вирусы, а РНК, изолированную из гомологичных вирусных маточных растворов, применяли как

контроль. Несмотря на то, что доступные контроли проявляли положительную реакцию с соответствующими вирусоспецифичными праймерами, вновь идентифицированные вирусные изоляты не реагировали с любым набором праймеров, что означало, что данный вирус не является близкородственным для тестируемых вирусов.

Авторы настоящего изобретения использовали супернатанты двух инфицированных вирусом клеточных культур tMK для интраназальной инокуляции морским свинкам и хорькам. Сыворотки этих животных собирали на нулевые сутки, через две и три недели после инокуляции. У животных не обнаружили клинических симптомов, но у всех проходила сероконверсия, что измеряли анализами нейтрализации вируса (VN) и непрямым IFA против гомологичных вирусов. В непрямом IFA сыворотки не реагировали ни с одним из известных парамиксовирусов, описанных выше, и с PVM. Далее, применяя сыворотки морских свинок и хорьков перед и после инфицирования, авторы настоящего изобретения скринировали пока не идентифицированные вирусные изоляты, из которых 28 являлись безусловно положительными при применении непрямого IFA с сыворотками после инфицирования, что означало, что данные изоляты серологически близкородственны или идентичны.

#### RAP PCR

Для получения информации о последовательности неизвестных вирусных изолятов авторы настоящего изобретения применили стратегию амплификации PCR со случайными праймерами, известной как RAP-PCR<sup>10</sup>. С этой целью, клетки tMK инфицировали одним из вирусных изолятов (изолят 00-1), а также hPIV-1, который служил контролем. После того, как в обеих культурах обнаружили сходные уровни СРЕ, вирус в супернатантах культур очистили на непрерывных градиентах 20-60% сахарозы. Фракции градиента посредством ЕМ проверяли на предмет наличия вирусоподобных частиц, и из фракции, где обнаружили нуклеокапсиды, содержащей примерно 50% сахарозы, выделили РНК. Эквивалентные количества РНК, изолированной из обеих вирусных фракций, использовали в RAP-PCR, после которой образцы, один рядом с другим, разделяли в 3% агарозном геле NuSieve. Потом из геля очистили двадцать различимых полос, специфичных для неидентифицированного вируса, клонировали в плазмиде pCR2.1 (Invitrogen) и определили последовательность с применением специфичных для вектора праймеров. Когда авторы настоящего изобретения использовали данные последовательности для поиска гомологии с последовательностями в базе данных Genbank, применяя программное обеспечение BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)), 10 из 20 фрагментов обнаружили сходство с последовательностями APV/TRTV.

Данные 10 фрагментов расположены в генах, кодирующих нуклеопротеин (N; фрагменты 1 и 2), матричный белок (M; фрагмент 3), белок слияния (F; фрагменты 4, 5, 6, 7) и белок полимеразы (L; фрагменты 8, 9, 10) (фиг. 2). Далее авторы настоящего изобретения подобрали праймеры PCR для завершения определения информации о последовательности на 3'-конце вирусного генома, на основе фрагментов RAP PCR авторов настоящего изобретения, а также на опубликованных лидерных и концевых последовательностях для Pneumovirinae<sup>6</sup>.

Амплифицировали три фрагмента: фрагмент А охватывал крайний 3'-концевой отрезок открытой рамки считывания (ORF) для N, фрагмент В охватывал ORF для фосфопротеина (P), а фрагмент С перекрывал промежуток между ORF для M и F (фиг. 2). Анализы последовательности данных трех фрагментов выявили отсутствие ORF для NS1 и NS2 на крайнем 3'-концевом отрезке вирусного генома и расположение ORF для F непосредственно рядом с ORF для M. Данная организация генома имеет сходство с организацией генома метапневмовируса APV, что также согласуется с гомологией последовательности. Суммарно, транслированные последовательности ORF для N, P, M и F продемонстрировали в среднем 30-33% гомологии с представителями рода Pneumovirus и 66-68% с представителями рода Metapneumovirus. Для ORF для SH и G не обнаружили видимой гомологии с обоими из родов. Обнаруженные для N гомологии аминокислот составляют примерно 40% с hRSV и 88% с APV-C, его наиболее близкими генетическими родственниками, что, например, можно вывести посредством сравнения аминокислотной последовательности фиг. 3 с аминокислотной последовательностью соответствующих белков N у других вирусов. Аминокислотная последовательность P обладает гомологией с hRSV в размере примерно 25% и с APV-C - примерно 66-68%, M с hRSV - примерно 36-39% и с APV-C примерно 87-89%, F с hRSV - примерно 40% и с APV-C примерно 81%, M2-1 с пневмовирусами - примерно 34-36% и с APV-C примерно 84-86%, M2-2 с пневмовирусами - примерно 15-17% и с APV-C примерно 56%, а фрагменты, полученные для L с пневмовирусами, обладают в среднем 44% и с APV-C 64%.

#### Филогенез

Хотя поиски BLAST с применением нуклеотидных последовательностей, полученных из неидентифицированных вирусных изолятов, выявили гомологии главным образом с представителями Pneumovirinae, на основе гомологии белковых последовательностей также выявлено некоторое сходство с другими парамиксовирусами (данные не показаны). Как показатель родства между вновь идентифицированными вирусным изолятом и представителями Pneumovirinae, на основе ORF для N, P, M и F данных вирусов построены филогенетические деревья. На всех четырех филогенетических деревьях вновь идентифицированный вирусный изолят являлся наиболее близкородственным с APV (фиг. 4). Из четырех описанных<sup>11</sup> серотипов APV, серотип APV C, метапневмовирус, первоначально обнаруженный у птиц в США,

обнаружил наиболее близкое соответствие с вновь идентифицированным вирусом. Однако необходимо отметить, что для серотипа APV D доступна только часть информации о последовательности.

Для установления родства различных вновь идентифицированных авторами настоящего изобретения вирусных изолятов, авторы настоящего изобретения построили филогенетические деревья, основываясь на информации о последовательности, полученной из 8-9 изолятов (8 для F, 9 для N, M и L). С этой целью авторы настоящего изобретения применяли RT-PCR с праймерами, подобранными для амплификации коротких фрагментов ORF для N, M, F и L, для которых впоследствии прямым способом определили последовательность. Девять вирусных изолятов, которые ранее определили как родственные посредством серологических способов (см. выше), также определили как родственные генетически. Практически, все девять изолятов оказались более близкородственными друг другу, чем APV. Хотя использованная для данных филогенетических деревьев информация о последовательности являлась ограниченной, оказывается, что девять изолятов можно разделить на две группы, где изоляты 94-1, 99-1 и 99-2 объединяются в одну группу, а другие шесть изолятов (94-2; 93-1; 93-2; 93-3; 93-4; 00-1) - в другую (фиг. 5).

#### Доминирование серотипа

Для изучения доминирования серотипа вируса в популяции людей авторы настоящего изобретения тестировали сыворотки людей различных возрастных категорий посредством непрямого IFA, применяя клетки tMK, инфицированные одним из неидентифицированных вирусных изолятов. Данный анализ выявил, что у 25% детей между шестью и двенадцатью месяцами присутствовали антитела к вирусу, а к возрасту 5 лет почти 100% детей оказались серопозитивными. В итоге, 56 образцов сыворотки, проверенных посредством непрямого IFA, тестировали посредством анализа VN. Для 51 (91%) образца результаты анализа VN (титр  $>8$ ) совпадают с полученными непрямым IFA результатами (титр  $>32$ ). Четыре образца, которые ранее посредством непрямого IFA определили как позитивные, оказались негативными при тесте VN (титр  $<8$ ), тогда как одна сыворотка, отрицательно реагировавшая при IFA (титр  $>32$ ), при тесте VN оказалась положительной (титр 16) (табл. 2).

IFA, проведенный с 72 сыворотками, собранными у людей в 1958 году (возраст в диапазоне 8-99 лет)<sup>12,27</sup>, выявил 100% доминирования генотипа, указывая на то, что вирус циркулировал в популяции людей более чем 40 лет. Кроме того, ряд данных сывороток применяли в анализе VN для подтверждения данных IFA (табл. 2).

Генетические анализы генов N, M, P и F выявили, что MPV обладает более высокой гомологией последовательности с ранее предложенным родом *Metapneumovirinae* (в среднем 63%), чем при сравнении с родом *Pneumovirinae* (в среднем 30%), таким образом, демонстрируя геномную организацию, подобную APV/TRTV и схожую с ним. В отличие от геномной организации вирусов RSV ('3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'), у метапневмовирусов отсутствуют гены NS1 и NS2, а также отличается расположение генов между M и L ('3-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'). Отсутствие ORF между генами M и F в вирусных изолятах авторов настоящего изобретения, отсутствие NS1 и NS2, расположенных вблизи N, и обнаруженная высокая степень гомологии аминокислотной последовательности с APV являются основаниями предложить классификацию MPV, выделенного у людей как первого представителя рода *Metapneumovirus* млекопитающих, в частности человеческого происхождения.

Филогенетические анализы выявили, что девять изолятов MPV, для которых получена информация о последовательности, являются близкородственными. Хотя информация о последовательности являлась ограниченной, практически они являлись более близкородственными друг другу, чем любому из метапневмовирусов птиц. Из четырех описанных серотипов APV, основываясь на генах N, P, M и F, серотип C являлся наиболее близкородственным к MPV. Однако нужно заметить, что в Genbank для гена F серотипа D доступной являлась только часть последовательности, а для серотипа B доступными являлись только последовательности генов M, N и F. Изоляты MPV авторов настоящего изобретения формировали два кластера на филогенетических деревьях. И для hRSV и для APV описаны различные генетические и серологические подтипы. Представляют ли два генетических кластера изолятов MPV также функционально отличающиеся серологические подгруппы, остается в настоящее время неизвестным. Серологические наблюдения авторов настоящего изобретения показали, что MPV является обычным патогенным микрорганизмом человека. Повторная изоляция данного вируса из клинических образцов детей с тяжелой RTI показывает, что клиническое и экономическое влияние MPV может являться высоким. Новые диагностические способы, основывающиеся на обнаружении вируса и серологии, позволяют более подробный анализ сферы действия и клинического и экономического влияния данного вирусного патогенного микроорганизма.

Незначительная разница результатов у IFA и VN (5 образцов) может представлять собой следствие того, что IFA детектирует только сывороточные IgG-антитела, тогда как анализ VN детектирует оба класса и подкласса антител, или разница может быть следствием разницы чувствительности между данными двумя анализами. Для IFA применяли крайнее значение 16, тогда как для VN - 8.

С другой стороны, разница между анализами IFA и VN может также означать возможную разницу между различными серотипами данного вновь идентифицированного вируса. Так как кажется, что MPV более близкородственен к APV, авторы настоящего изобретения предполагают, что вирус человека мог возникнуть от птиц. Анализ образца сыворотки, взятой у людей в 1958 году, выявил, что MPV являлся

широко распространенным в популяции людей более 40 лет, указывая на то, что предполагаемый случай зооноза должен был произойти задолго до 1958 года.

### Материалы и методы

#### Коллекция образцов

В течение последних десятилетий лаборатория авторов настоящего изобретения собирала назофарингеальные аспитраты детей, страдающих RTI, которые стандартным образом проверяли на предмет присутствия вирусов. Все назофарингеальные аспитраты тестировали посредством прямых иммунофлуоресцентных анализов (DIF), применяя флуоресцентно меченные антитела против вирусов гриппа типов А и В, hRSV и вируса парагриппа человека (hPIV) типов 1-3. Назофарингеальные аспитраты также обрабатывали для выделения вируса, применяя быстрые способы снятия оболочки<sup>14</sup> на различных линиях клеток, включая клетки VERO, третичные клетки почки макака-крабоеда (tMK), клетки эпителия легкого человека (HEL) и клетки почки собаки Madin-Darby (MDCK). Образцы, в которых обнаружили цитопатический эффект (CPE) после двух-трех пассажей и которые оказались негативными в DIF, тестировали посредством непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFA), применяя антитела, специфичные против вируса гриппа типов А, В и С, hRSV типов А и В, вируса кори, вируса свинки, вируса парагриппа человека (hPIV) типов 1-4, вируса Сендей, обезьяньего вируса типа 5 и вируса болезни Ньюкасла. Хотя во многих случаях этиологический агент не смогли идентифицировать, некоторые образцы оказались негативными для всех тестируемых вирусов.

#### Прямой иммунофлуоресцентный анализ (DIF)

Назофарингеальные аспитраты пациентов, страдающих RTI, использовали для DIF и выделения вируса, как описано<sup>14,15</sup>. Образцы хранили при -70°C. Коротко, назофарингеальные аспитраты разводили 5 мл Dulbecco MEM (BioWhittaker, Walkersville, MD) и одну минуту тщательно перемешивали на устройстве типа "вортекс". Таким образом, суспензию центрифугировали десять минут при 840x g. Осадок распределяли на предметном стекле для многих образцов (Nutacon, Leimuiden, The Netherlands), а супернатант использовали для выделения вируса. После сушки, клетки 1 мин фиксировали в ацетоне при комнатной температуре. После отмычки предметные стекла инкубировали 15 мин при 37°C с коммерчески доступными антисыворотками, специфичными к вирусам, таким как грипп А и В, hRSV и hPIV 1-3 (Dako, Glostrup, Denmark), меченными FITC. После трех отмывок в PBS и одной в проточной воде, предметные стекла помещали в раствор глицерин/PBS (Citifluor, UKC, Canterbury, UK) и покрывали. Предметные стекла анализировали с применением флуоресцентного микроскопа Axioscop (Carl Zeiss B.V, Weesp, the Netherlands).

#### Выделение вируса

Для выделения вируса клетки tMK (RIVM, Bilthoven, The Netherlands) культивировали в 24-луночных планшетах, содержащих предметные стекла (Costar, Cambridge, UK), в описанной ниже среде, дополненной до 10% фетальной бычьей сывороткой (BioWhittaker, Vervier, Belgium). Перед инокуляцией планшеты отмывали в PBS и заполняли Eagle's MEM с солью Hanks (ICN, Costa mesa, CA), половину литра которой дополнили до 0,26 г NaHCO<sub>3</sub>, 0,25 М HEPES (Biowhittaker), 2 mM L-глутамина (Biowhittaker), 100 единиц пенициллина, 100 мкг стрептомицина (Biowhittaker), 0,5 г молочного альбумина (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands), 1,0 г D-глюкозы (Merck, Amsterdam, The Netherlands), 5,0 г пептона (Oxoid, Haarlem, The Netherlands) и 0,02% трипсина (Life Technologies, Bethesda, MD). Планшеты инокулировали супернатантом образцов назофарингеального аспириата в размере 0,2 мл на каждую лунку по три лунки на образец, с последующим центрифугированием один час при 840x g. После инокуляции планшеты инкубировали максимум 14 суток при 37°C, меняя среду один раз в неделю и ежедневно контролируя культуры на предмет наличия CPE. После 14 суток клетки соскабливали из второго пассажа и инкубировали 14 суток. Данный шаг повторили для третьего пассажа. Предметные стекла использовали для демонстрации наличия вируса посредством непрямого IFA, как описано ниже.

#### Иммунизация животных

Для вновь обнаруженных вирусов получили специфичные антисыворотки хорьков и морских свинок посредством экспериментального интраназального инфицирования двух хорьков и двух морских свинок, не инфицированных специфичным патогенным микроорганизмом и содержавшихся в отдельных герметичных стерильных камерах с перчатками. Две-три недели спустя у всех животных забрали кровь посредством сердечной пункции, и их сыворотки использовали в качестве сывороток сравнения. Сыворотки тестировали на предмет наличия всех ранее описанных вирусов посредством непрямого IFA, как описано ниже.

#### Выявление антигена посредством непрямого IFA

Авторы настоящего изобретения провели непрямой IFA на предметных стеклах, содержащих инфицированные клетки tMK. После отмычки в PBS предметные стекла инкубировали 30 мин при 37°C с сыворотками, специфичными к вирусу. В DIF авторы настоящего изобретения использовали моноклональные антитела против гриппа А, В и С, hPIV типов с 1 по 3 и hRSV, как описано выше. Для hPIV типа 4, вируса свинки, вируса кори, вируса Сендей, обезьяньего вируса типа 5, вируса болезни Ньюкасла использовали поликлональные антитела (RIVM) и сыворотки сравнения хорьков и морских свинок. После трех отмывок в PBS и одной в проточной воде, предметные стекла окрашивали вторичными антителами,

направленными против сывороток, применявшихся в первой инкубации. Вторичные антитела для поликлональных антисывороток представляли собой антитела козы против антител хорька (KPL, Guilford, UK, разведенные в 40 раз), антитела мыши против антител кролика (Dako, Glostrup, Denmark, разведенные в 20 раз), антитела кролика против антител цыплят (KPL, разведенные в 20 раз) и антитела мыши против антител морских свинок (Dako, разведенные в 20 раз). Предметные стекла обрабатывали, как описано для DIF.

#### **Выявление антигена у людей посредством непрямого IFA**

Для выявления антител, специфичных к вирусу, инфицированные клетки tMK фиксировали охлажденным ацетоном на покровных стеклах, отмывали в PBS и окрашивали образцами сыворотки в разведении от 1 до 16. Далее, образцы окрашивали 80-кратно разведенными в PBS меченными FITC антителами кролика против антител человека (Dako). Предметные стекла обрабатывали, как описано выше.

#### **Культура вируса MPV**

Субконфлюнтный монослой клеток tMK в среде, как описано выше, инокулировали супернатантами образцов с зарегистрированным после второго или третьего пассажа в 24-луночных планшетах СРЕ. Культуры ежедневно контролировали на предмет наличия СРЕ, а среду меняли один раз в неделю. Поскольку у каждого изолята СРЕ различается, все культуры с 12 по 14 сутки проверяли непрямым IFA с антителами хорька против новых вирусных изолятов. Позитивные культуры три раза подвергали замораживанию-оттаиванию, после чего очищали супернатанты посредством низкоскоростного центрифугирования, разделяли и хранили замороженными при -70°C. Дозы вируса в единицах 50% инфицирования тканевых культур (TCID50) в супернатантах культур определяли, как описано<sup>16</sup>.

#### **Анализ нейтрализации вируса**

Анализы VN проводили серийными двукратными разведениями сывороток человека и животных, начиная с восьмикратного разведения. Разведенные сыворотки инкубировали один час со 100 TCID50 вируса перед инокуляцией клеток tMK, растущих в 96-луночных планшетах, после чего планшеты центрифугировали при 840x g. Среду меняли на третью и шестые сутки, а IFA с антителами хорька против MPV проводили через 8 суток после инокуляции. Титр VN определяли как наибольшее разведение образца сыворотки, приводящее к негативному результату в IFA и ингибирующее СРЕ в клеточных культурах.

#### **Характеристика вируса**

Анализы гемагглютинации и тесты чувствительности к хлороформу проводили, как описано ранее<sup>8,14</sup>. Для анализов посредством ЕМ, вирус концентрировали из супернатантов инфицированных клеточных культур в микроцентрифуге при 4°C при 17000x g, после чего осадок ресуспендировали в PBS и проверяли посредством негативной контрастной ЕМ. Для RAP-PCR вирус концентрировали из инфицированных клеток tMK посредством ультрацентрифугирования на подушке 60% сахарозы (2 часа при 150000x g, 4°C). Потом интерфазу 60% сахарозы развели PBS и наслоили сверху на 20-60% непрерывный градиент сахарозы, который центрифугировали 16 ч при 275000x g при 4°C. Фракции градиента сахарозы проверяли на предмет наличия вирусоподобных частиц посредством ЕМ и электрофореза в поликариламидном геле с окрашиванием серебром. Примерно 50% фракций сахарозы, в которых обнаружили наличие нуклеокапсидов, использовали для выделения РНК и RAP-PCR.

#### **Выделение РНК**

РНК выделяли из супернатантов инфицированных клеточных культур или фракций сахарозного градиента, применяя набор High Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands) по инструкциям производителя.

#### **RT-PCR**

Вирусоспецифичные последовательности олигонуклеотидов для RT-PCR известных парамиксовирусов описаны в приложении 1. Одношаговый RT-PCR проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM дитиотреитол, 200 мкМ каждого dNTP, 10 единиц рекомбинантной RNAsin (Promega, Leiden, the Netherlands), 10 единиц AMV RT (Promega, Leiden, The Netherlands), 5 единиц AmpliTaq Gold DNA polymerase (PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands) и 5 мкл РНК. Условия цикла представляли собой однократную инкубацию 45 мин при 42°C и 7 мин при 95°C, повторенные 40 раз 1 мин при 95°C, 2 мин при 42°C и 3 мин при 72°C и однократную инкубацию 10 мин при 72°C.

#### **RAP-PCR**

RAP-PCR, по существу, проводили, как описано ранее<sup>10</sup>. Последовательности олигонуклеотидов описаны в приложении 2. Для реакции RT 2 мкл РНК использовали в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг/мкл олигонуклеотида, 10 mM дитиотреитол, 500 мкм каждого dNTP, 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl и 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Реакционную смесь инкубировали 5 мин при 70°C и 5 мин при 37°C, после чего добавили 200 единиц Superscript RT enzyme (LifeTechnologies). Инкубация при 37°C продолжалась 55 мин, а реакцию останавливали посредством 5 мин инкубации при 72°C. Смесь RT растворяли для получения 50 мкл реакционной смеси для PCR, содержащей 8 нг/мкл олигонуклеотида, 300 мкм каждого dNTP, 15 mM Tris-HCl pH 8,3, 65 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> и 5 единиц ДНК-полимеразы Taq (PE Biosystems). Условия цикла представляли собой однократную инкубацию 5 мин при 94°C, 5 мин при 40°C и 1 мин

при 72°C, с последующими, повторенными 40 раз 1 мин при 94°C, 2 мин при 56°C и 1 мин при 72°C и однократную инкубацию 5 мин при 72°C. После RAP-PCR 15 мкл продукта RT-PCR один рядом с другим разделили в 3% агарозном геле NuSieve (FMC BioProducts, Heerhugowaard, The Netherlands). Различимые фрагменты, специфичные для MPV, очищали из геля посредством набора Qiaquick Gel Extraction (Qiagen, Leusden, The Netherlands) и клонировали в векторе pCR2.1 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) по инструкциям производителя.

#### Анализ последовательности

Для продуктов RAP-PCR, клонированных в векторе pCR2.1 (Invitrogen), определили последовательность со специфичными для M13 олигонуклеотидами. Фрагменты ДНК, полученные посредством RT-PCR, очищали из агарозного геля посредством набора Qiaquick Gel Extraction (Qiagen, Leusden, The Netherlands) и определяли последовательность прямым способом с теми же олигонуклеотидами, что и для PCR. Анализы последовательности проводили с применением набора Dyenamic ET terminator sequencing (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, The Netherlands) и автоматического ДНК-секвенатора ABI 373 (PE Biosystem). Все способы проводили по инструкциям производителя.

#### Получение фрагментов генома MPV посредством RT-PCR

Для получения фрагментов PCR, перекрывающих промежутки A, B и C между фрагментами RAP-PCR (фиг. 2), авторы настоящего изобретения применяли анализ RT-PCR PHK, выделенной из вирусного изолята 00-1, как описано ранее. Применяли следующие праймеры:

Для фрагмента A: TR1 (5'-AAAGAATTCAAGAGAAAAAACGC-3'), подобранный к лидерному концу, и N1 (5'-CTGTGGTCTAGTCCCACTTC-3'), подобранный к 3'-концу фрагментов RAP-PCR, полученных из N.

Для фрагмента B: N2 (5'-CATGCAAGCTTATGGGGC-3'), подобранный к 5'-концу фрагментов RAP-PCR, полученных из N, и M1 (5'-CAGAGTGGTTATTGTCAGGGT-3'), подобранный к 3'-концу фрагментов RAP-PCR, полученных из M.

Для фрагмента C: M2 (5'-GTAGAACTAGGAGCATATG-3'), подобранный к 5'-концу фрагментов RAP-PCR, полученных из M, и F1 (5'-TCCCCAATGTAGATACTGCTTC-3'), подобранный к 3'-концу фрагментов RAP-PCR, полученных из F. Фрагменты очищали из геля, клонировали и определяли последовательность, как описано ранее.

#### RT-PCR для диагностики MPV

Для амплификации и определения последовательности частей ORF для N, M, F и L девяти из изолятов MPV авторы настоящего изобретения использовали праймеры N3 (5'-GCACTCAAGAGA TACCCCTAG-3') и N4 (5'-AGACTTTCTGCTTGCTGCCTG-3'), амплифицируя фрагменты, состоящие из 151 нуклеотида, M3 (5'-CCCTGACAATAACCACTCTG-3') и M4 (5'-GCCAACTGATTTGGCTGAGCTC3'), амплифицируя фрагмент, состоящий из 252 нуклеотидов, F7 (5'-TGCACATATCCCTCTGGGGCTTG-3') и F8 (5'-TCAAAGCTGCTTGACACTGGCC-3'), амплифицируя фрагмент, состоящий из 221 нуклеотида и L6 (5'-CATGCCCACTATAAAAGGTCAG-3') и L7 (5'-CACCCCAGTCTTCTTGAAA-3'), амплифицируя фрагмент, состоящий из 173 нуклеотидов, соответственно. RT-PCR, очистка из геля и прямое определение последовательности проводили, как описано выше. Кроме того, использовали зонды:

Зонд, используемый для M: 5'-TGCTGTACTTCCCAAAG-3'

Зонд, используемый для N: 5'-TATTGAAACAAAAAGTGT-3'

Зонд, используемый для L: 5'-TGGTGTGGGATATTAACAG-3'

#### Филогенетические анализы

Для всех филогенетических деревьев, последовательности ДНК выравнивали с применением программного пакета ClustalW, а деревья максимального правдоподобия получали с применением программного пакета DNA-ML программного обеспечения Phylogenetic 3.5 с применением 100 условий инициализации и 3 перестановок<sup>15</sup>. Для получения филогенетических деревьев использовали ранее опубликованные последовательности, доступные в Genbank с номерами доступа: все ORF: hRSV: NC001781; bRSV: NC001989; ORF для F: PVM, D11128; APV-A, D00850; APV-B, Y14292; APV-C, AF187152; ORF для N: PVM, D10331; APV-A, U39295; APV-B, U39296; APV-C, AF176590; ORF для M: PMV, U66893; APV-A, X58639; APV-B, U37586; APV-C, AF262571; ORF для R: PVM, 09649; APV-A, U22110, APV-C, AF176591. Филогенетические анализы для девяти вирусных изолятов MPV проводили со штаммом APV-C в качестве внешней группы.

Аббревиатуры, применяемые на фигурах: hRSV: человеческий RSV; bRSV: бычий RSV; PVM: вирус пневмонии мышей; APV-A, -B и -C: пневмовирус птиц, типы A, B и C.

#### Примеры способов идентификации MPV

##### Коллекция образцов

В целях обнаружения вирусных изолятов необходимо изучать назофарингеальные аспиранты, глоточные и назальные мазки, бронхоальвеолярные смывы предпочтительно млекопитающих, таких как человек, плотоядные (собаки, кошки, куницы, тюлени и т.п.), лошади, жвачные (крупный рогатый скот, овцы, козы и т.п.), свиньи, кролики, птицы (домашняя птица, страусы). У птиц также можно изучать мазки из клоаки и помет. Для иммунологических анализов, таких как ELISA и анализ нейтрализации вируса, необходимо собирать сыворотки.

Собранные вирусные образцы разводили 5 мл среды Dulbecco MEM (BioWhittaker, Walkersville, MD) одну минуту тщательно перемешивали на устройстве типа "вортекс". Таким образом, суспензию центрифугировали десять минут при 840x g. Осадок распределяли на покровном стекле для многих образцов (Nutacon, Leimuiden, The Netherlands), а супернатант использовали для выделения вируса.

#### **Выделение вируса**

Для выделения вируса, клетки tMK (RIVM, Bilthoven, The Netherlands) культивировали в 24-луночных планшетах, содержащих предметные стекла (Costar, Cambridge, UK), в описанной ниже среде, дополненной до 10% фетальной бычьей сыворотки (BioWhittaker, Vervier, Belgium). Перед инокуляцией планшеты отмывали в PBS и заполняли Eagle's MEM с солью Hanks (ICN, Costa mesa, CA) дополненной до 0,52 г/л  $\text{NaHCO}_3$ , 0,025M HEPES (Biowhittaker), 2 мМ L-глутамина (Biowhittaker), 200 единиц/л пенициллина, 200 мкг/л стрептомицина (Biowhittaker), 1,0 г/л молочного альбумина (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands), 2,0 г/л D-глюкозы (Merck, Amsterdam, The Netherlands), 10,0 г/л пептона (Oxoid, Haarlem, The Netherlands) и 0,02% трипсина (Life Technologies, Bethesda, MD). Планшеты инокулировали супернатантом образцов назофарингеального аспирата в размере 0,2 мл на каждую лунку по три лунки на образец, с последующим центрифугированием один час при 840x g. После инокуляции планшеты инкубировали максимум 14 суток при 37°C, меняя среду один раз в неделю и ежедневно контролируя культуры на предмет наличия СРЕ. После 14 суток клетки сокабливали из второго пассажа и инкубировали 14 суток. Данный шаг повторили для третьего пассажа. Предметные стекла использовали для демонстрации наличия вируса посредством непрямого IFA, как описано ниже.

СРЕ обычно наблюдали после третьего пассажа, с 8 по 14 сутки в зависимости от изолята. В tMK или других клеточных культурах СРЕ практически не отличался от СРЕ, вызванного hRSV или hPIV. Однако, hRSV индуцирует СРЕ, начиная примерно с 4 суток. СРЕ характеризовался образованием синцития, после чего клетки демонстрировали быстрое внутреннее разрушение с последующим их отделением от монослоя. Для некоторых изолятов наблюдение СРЕ представляло затруднение и, для подтверждения присутствия вируса в данных культурах, применяли IFA.

#### **Культура вируса MPV**

Субконфлюентный монослой клеток tMK в среде, как описано выше, инокулировали супернатантами образцов с зарегистрированным после второго или третьего пассажа в 24-луночных планшетах СРЕ. Культуры ежедневно контролировали на предмет наличия СРЕ, а среду меняли один раз в неделю. Поскольку СРЕ отличается у каждого изолята, все культуры с 12 по 14 сутки проверяли непрямым IFA с антителами хорька против новых вирусных изолятов. Позитивные культуры три раза подвергали замораживанию-оттаиванию, после чего очищали супернатанты посредством низкоскоростного центрифугирования, разделяли и хранили замороженными при -70°C. Дозы вируса 50% инфицирования тканевых культур (TCID50) в супернатантах культур определяли, как описано<sup>16</sup>.

#### **Характеристика вируса**

Анализы гемагглютинации и тесты чувствительности к хлороформу проводили, следуя хорошо отработанным и описанным способам, применяемым в данной области<sup>14</sup>. Для анализов посредством ЕМ, вирус концентрировали из супернатантов инфицированных клеточных культур в микроцентрифуге при 4°C при 17000x g, после чего осадок ресуспенсировали в PBS и проверяли посредством негативной контрастной ЕМ.

#### **Выявление антигена посредством непрямого IFA**

Собранные образцы обрабатывали, как описано, а осадок образцов распределяли на предметном стекле для многих образцов. После сушки, клетки 1 мин фиксировали в ацетоне при комнатной температуре.

Альтернативно, вирус культивировали на клетках tMK в 24-луночных направляющих, содержащих предметные стекла. Данные предметные стекла отмывали в PBS и 1 мин фиксировали в ацетоне при комнатной температуре.

После отмывки в PBS предметные стекла инкубировали 30 мин при 37°C с поликлональными антителами, разведенными в PBS от 1:50 до 1:100. Для получения поликлональных антител авторы настоящего изобретения использовали иммунизированных хорьков и морских свинок, но данные антитела можно активировать у других млекопитающих, а рабочее разведение поликлональных антител может варьироваться для каждой иммунизации. После трех отмывок в PBS и одной в проточной воде, предметные стекла инкубировали 30 мин при 37°C с козьими антителами против антител хорька мечеными FITC (KPL, Guilford, UK, разведенные в 40 раз). После трех отмывок в PBS и одной в проточной воде предметные стекла помещали в раствор глицерин/PBS (Citifluor, UKC, Canterbury, UK) и покрывали. Предметные стекла анализировали с применением флуоресцентного микроскопа Axioscop (Carl Zeiss B.V, Weesp, the Netherlands).

#### **Выявление антител у людей, млекопитающих, жвачных или других животных посредством непрямого IFA**

Для выявления специфичных для вируса антител, инфицированные клетки tMK с MPV фиксировали с ацетоном на покровных стеклах (как описано выше), отмывали в PBS и инкубировали 30 мин при 37°C с образцами сывороток в разведении от 1 до 16. После двух отмывок в PBS и одной в проточной

воде, предметные стекла инкубировали 30 мин при 37°C с меченными FITC вторичными антителами к виду (Dako). Предметные стекла обрабатывали, как описано выше.

Антитела можно метить флуоресцентным красителем непосредственно, что приведет к прямому иммунофлуоресцентному анализу. FITC можно заменить любым флуоресцентным красителем.

#### Иммунизация животных

Для вновь обнаруженных вирусов получили специфичную антисыворотку хорьков и морских свинок посредством экспериментального интраназального инфицирования двух хорьков и двух морских свинок, не инфицированных специфичным патогенным микроорганизмом и содержавшихся в отдельных герметичных стерильных камерах с перчатками. Две-три недели спустя у всех животных забрали кровь посредством сердечной пункции и их сыворотки использовали в качестве сывороток сравнения. Сыворотки тестировали на предмет наличия всех ранее описанных вирусов посредством непрямого IFA как описано ниже. Другие виды животных также подходят для получения препаратов специфичных антител, а также можно применять другие антигенные препараты.

#### Анализ нейтрализации вируса

Анализы VN проводили серийными двукратными разведениями сывороток человека и животных, начиная с восьмикратного разведения. Перед инокуляцией клеток tMK, растущих в 96-луночных планшетах, разведенные сыворотки инкубировали один час со 100 TCID50 вируса, после чего планшеты центрифугировали при 840x g. Применяли ту же среду, как и описанная выше. Среду меняли на третью и шестые сутки, а IFA проводили через 8 суток после (см. выше). Титр VN определяли как наибольшее разведение образца сыворотки, приводящее к негативному результату в IFA и ингибирующее CPE в клеточных культурах.

#### Выделение РНК

РНК выделяли из супернатантов инфицированных клеточных культур или фракций сахарозного градиента, применяя набор High Pure RNA Isolation, по инструкциям производителя (Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands). РНК можно выделять другими способами, общезвестными в данной области (Current Protocols in Molecular Biology).

#### RT-PCR

Одношаговый RT-PCR проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl pH 8,5, 50 мМ NaCl, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ дитиотреитол, 200 мкМ каждого dNTP, 10 единиц рекомбинантной RNAsin (Promega, Leiden, the Netherlands), 10 единиц AMV RT (Promega, Leiden, the Netherlands), 5 единиц AmpliTaq Gold DNA polymerase (PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands) и 5 мкл РНК. Условия цикла представляли собой однократную инкубацию 45 мин при 42°C и 7 мин при 95°C, повторенные 40 раз 1 мин при 95°C, 2 мин при 42°C и 3 мин при 72°C и однократную инкубацию 10 мин при 72°C.

Для диагностической PCR применяли следующие праймеры:

Для нуклеопротеина: N3(5'-GCACTCAAGAGATACCCTAG-3') и N4(5'-AGACTTTCTGCTTGCT GCCTG-3'), амплифицируя фрагмент, состоящий из 151 нуклеотида. Для матричного белка: M3 (5'-CCCTGACAATAACCACTCTG-3') и M4 (5'-GCCAACTGATTGGCTGAGCTC3'), амплифицируя фрагмент, состоящий из 252 нуклеотидов. Для белка полимеразы: L6 (5'-CATGCCCACTATAAAAGGTCAG-3') и L7 (5'-CACCCCCAGTCTTCTTGAAA-3'), амплифицируя фрагмент, состоящий из 173 нуклеотидов. На основе последовательностей MPV можно подобрать другие праймеры, а также, для конкретных целей, можно использовать другие буферы и условия анализа.

#### Анализ последовательности

Анализы последовательности проводили с применением набора Dyenamic ET terminator sequencing (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, The Netherlands) и автоматического ДНК-секвенатора ABI 373 (PE Biosystem). Все способы проводили по инструкциям производителя. У фрагментов после PCR прямым способом определили последовательность с теми же олигонуклеотидами, что и для PCR или фрагменты очищали из геля посредством набора Qiaquick Gel Extraction (Qiagen, Leusden, The Netherlands), клонировали в векторе pCR2.1 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) по инструкциям производителя, а потом определяли последовательность со специфичными для M13 олигонуклеотидами.

#### Применяемые для анализа 3'-конца генома (отсутствие NS1/NS2) олигонуклеотиды

Основываясь на опубликованных Randhawa (1997) концевой и лидерной последовательностях hRSV и APV, подобрали праймер TR1 (5'-AAAGAATTCAAGAGAAAAAACGC-3') , а, основываясь на полученных для белка N последовательностях, подобрали праймер N1 (5'-CTGTGGTCTAGCCCCACTTC-3'). Анализ RT-PCR и определение последовательности проводили, как описано выше.

Результатом RT-PCR являлся продукт длиной примерно 500 пар оснований, являвшийся слишком маленьким, чтобы содержать информацию для двух ORF, а трансляция данных последовательностей не выявила ORF.

#### Выявление антител у людей, млекопитающих, жвачных и других животных посредством ELISA

У Paramyxoviridae белок N является наиболее представленным белком, и иммунный ответ на этот белок при инфицировании развивается рано. По этим причинам, для разработки анализа ELISA для выявления антитела к MPV предпочтительно применяют рекомбинантный источник белков N. Антигены,

подходящие для выявления антитела, включают любые белки MPV, связывающиеся с любыми специфичными к MPV антителами пациента, подвергавшегося воздействию вируса MPV или инфицированного им. Предпочтительные антигены по изобретению включают антигены, которые преимущественно порождают иммунный ответ у пациентов, подвергавшихся воздействию MPV, и которые, поэтому, наиболее легко узнают антитела пациента. Особенно предпочтительные антигены включают белки N, F и G из MPV. Антигены, применяемые в иммунологических способах, могут являться нативными или модифицированными. Для изменения аминокислотной последовательности антигена MPV, с целью получения модифицированного варианта антигена, который можно использовать в иммунологических способах, можно применять общеизвестные способы молекулярной биологии.

Способы клонирования генов, перемещения генов в экспрессирующие вектора и из них и экспрессии белка, кодируемого геном в гетерологичном хозяине, общеизвестны, и данные способы можно применять для предоставления экспрессирующих векторов, клеток-хозяев и клонированных для экспрессии генов, кодирующих антигены у хозяина для получения рекомбинантных антигенов для использования в диагностических анализах. См., например, *Molecular cloning, A laboratory manual and Current Protocols in Molecular Biology*.

Для получения антигенов MPV можно применять множество экспрессирующих систем. Например, для получения белков в *E.coli*, *B.subtilis*, дрожжах, клетках насекомых и млекопитающих описано множество подходящих экспрессирующих векторов, любой из которых можно применять для получения антигена MPV, подходящего для выявления антител против MPV у подвергшихся воздействию пациентов.

Бакуловирусная экспрессирующая система обладает преимуществом, предоставляя необходимую обработку белков, и поэтому предпочтительна. Система использует промотор полиэдрина для непосредственной экспрессии антигенов MPV (Matsuura et al., 1987, *J.Gen.Viro*l.68: 1233-1250).

Антигены, получаемые посредством рекомбинантных бакуловирусов, можно применять во множестве иммунологических анализов для выявления антител против MPV у пациента. Доказано, что рекомбинантные антигены можно использовать вместо настоящих вирусов практически в любом иммунологическом анализе для выявления антител, специфичных к вирусу. Анализы включают прямой и непрямой анализы, сэндвич-анализы, анализы в твердой фазе, такие, наряду с другими, как анализы с применением планшетов или бус и анализы в жидкой фазе. Подходящие анализы включают анализы, в которых применяют первичные и вторичные антитела, и анализы, в которых применяют связывающие реагенты, такие как белок A. Более того, множество способов выявления, которые можно применять по изобретению, включают способы, использующие колориметрию, флуоресценцию, фосфоресценцию, хемилюминесценцию, люминесценцию и радиоактивность.

Пример 1. Непрямой EIA с IgG против MPV с применением белка N.

Применяя белок N (получаемый посредством бакуловируса у клеток Sf9 насекомых) как антиген, можно провести непрямой EIA с IgG. Для получения антигена клетки Sf9 инфицировали рекомбинантным бакуловирусом и собирали на 3-7 сутки после инфицирования. Клеточную суспензию дважды отмывали в PBS, pH 7,2, доводя плотность клеток до  $5,0 \times 10^5$  клеток/мл, и три раза подвергали замораживанию-оттаиванию. Большие обломки клеток осаждали посредством низкоскоростного центрифугирования (15 мин при 500x g), а супернатанты собирали и до применения хранили при -70°C. Неинфицированные клетки обрабатывали сходным образом для отрицательного контроля антигена.

Для покрытия планшетов для микротитрования использовали 100 мкл лизата, обработанного замораживанием-оттаиванием, в разведениях в диапазоне от 1:50 до 1:1000. Неинфицированные клеточные лизаты вносили в спаренные лунки, где они служили отрицательным контролем. После ночной инкубации, планшеты дважды отмывали в PBS/0,05% Tween. Тестовые сыворотки разводили в соотношениях от 1:50 до 1:200 в буфере для ELISA (PBS, дополненный до содержания 2% нормальной козьей сыворотки, 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% коровьего молока), с последующей инкубацией лунок 1 час при 37°C.

Планшеты дважды отмывали в PBS/0,05% Tween. В лунки добавляли козы IgG против антител человека (или против антител других видов), меченные пероксидазой хрена и разведенные в соотношении от 1:3000 до 1:5000 в буфере для ELISA, и инкубировали 1 час при 37°C. Планшеты дважды отмывали в PBS/0,05% Tween и один раз в проточной воде, инкубировали с субстратом фермента TMB, 3,3',5,5'-тетраметилбензидином, например, полученным из Sigma, 15 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию 100 мкл 2 M фосфорной кислоты. Чтение результата посредством колориметрического измерения проводили при 450 нм с применением автоматического устройства для анализа планшетов для микротитрования.

Пример 2. EIA захвата IgM против MPV с применением рекомбинантного нуклеопротеина.

EIA захвата IgM против MPV с применением рекомбинантного нуклеопротеина или любого другого рекомбинантного белка в качестве антигена можно проводить посредством модификации ранее описанных Erdman et al. (1990) *J. Clin. Microb.* 29: 1466-1471 анализов.

В лунки планшета для микротитрования, в 0,1 M карбонатный буфер с pH 9,6, добавляли аффинно-очищенное захватывающее антитело против IgM человека (или против антител других видов), например

полученное из Dako в концентрации 250 нг на лунку. После ночной инкубации при комнатной температуре планшеты дважды отмывали в PBS/0,05% Tween. 100 мкл тестовой сыворотки, разведенной в соотношениях от 1:200 до 1:1000 в буфере для ELISA, вносили в лунки из расчета три лунки на образец и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем планшеты дважды отмывали в PBS/0,05% Tween.

Лизат клеток Sf21 (инфицированный рекомбинантным вирусом), обработанный замораживанием-оттаиванием и разведенный в диапазоне от 1:100 до 1:500 в буфере для ELISA, внесли в лунки и инкубировали 2 ч при 37°C. Неинфицированный лизат клеток служил отрицательным контролем, и его вносили в спаренную лунку. Затем планшеты трижды отмывали в PBS/0,05% Tween и инкубировали со 100 мкл поликлональных антител против MPV в оптимальном разведении в буфере для ELISA 1 ч при 37°C. После двух отмывок в PBS/0,05% Tween планшеты инкубировали с вторичными антителами (такими как антитела кролика против антител хорька), меченными пероксидазой хрена 20 мин при 37°C.

Затем планшеты пять раз отмывали в PBS/0,05% Tween, инкубировали с субстратом фермента TMB, 3,3',5,5'-тетраметилбензидином, например, полученным из Sigma, 15 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию 100 мкл 2 М фосфорной кислоты. Чтение результата посредством колориметрического измерения проводили при 450 нм с применением автоматического устройства для анализа планшетов для микротитрования.

Чувствительность EIA захвата IgM против MPV с применением рекомбинантного нуклеопротеина (или другого рекомбинантного белка) и целого вируса MPV определяли путем сравнения пар сывороток пациентов с клинической инфекцией MPV в острой фазе и фазе выздоровления. Специфичность EIA захвата рекомбинантного нуклеопротеина определяли посредством тестирования образцов сыворотки здоровых субъектов и субъектов с другими видами парамиксовирусной инфекции.

#### **Возможности EIA для использования белка слияния и гликопротеина, получаемых экспрессией бакуловирусов**

Гликопротеины G и F являются двумя трансмембранными оболочечными гликопротеинами вириона MPV и представляют собой главные антигены для нейтрализации и защитные антигены. Экспрессия данных гликопротеинов в системе вирусного вектора, такой как бакуловирусная система, предоставляет источник рекомбинантных антигенов для применения в анализах выявления антител, специфичных к MPV. Более того, их применение в комбинации с нуклеопротеином, например, дополнительно усиливает чувствительность ферментного иммунологического анализа при выявлении антител против MPV.

Как альтернативные описанным здесь способам можно применять множество других иммунологических анализов (Current Protocols in Immunology).

Для того чтобы обнаружить вирусные изоляты, можно также изучать назофарингеальные аспитраты, глоточные и назальные мазки, бронхоальвеолярные смывы и глоточные мазки предпочтительно людей, плотоядных (собак, кошек, тюленей и т.п.), лошадей, жвачных (крупного рогатого скота, овец, коз и т.п.), свиней, кроликов, птиц (домашней птицы, страусов), но не ограничиваясь ими. У птиц также можно изучать мазки из клоаки и помет. Для всех примеров для обнаружения вируса можно применять серологические способы (выявление антитела или антигена и т.п.), способы для выделения вируса и способы для выявления нуклеиновой кислоты. Моноклональные антитела можно получать посредством иммунизации мышей (или других животных) очищенным MPV или его частями (белки, пептиды) с последующим применением хорошо разработанной гибридомной технологии (Current Protocols in Immunology). Альтернативно, для данной цели можно применять технологию фагового дисплея (Current Protocols in Immunology). Подобным образом поликлональные антитела можно получать от инфицированных людей или животных, или от иммунизированных людей или животных (Current Protocols in Immunology).

Выявление присутствия или отсутствия белков NS1 и NS2 можно проводить, применяя вестерн-блоттинг, IFA, способы иммунопреципитации с использованием множества препаратов антител. Выявление присутствия или отсутствия в вирусных изолятах генов белков NS1 и/или NS2 или их гомологов можно проводить, применяя PCR с наборами праймеров подобранных на основании известных генов NS1 и NS2, а также множеством способов гибридизации нуклеиновой кислоты.

Для определения возможного присутствия генов NS1 и NS2 на 3'-конце вирусного генома можно проводить PCR с праймерами, специфичными к 3'-концу генома. В данном случае авторы настоящего изобретения использовали праймер, специфичный к 3'-нетранслируемой области вирусного генома и праймер к ORF для N. Для той же цели можно подобрать другие праймеры. Отсутствие генов NS1/NS2 выявляют посредством определения длины и/или определения последовательности продукта PCR. С целью сделать возможной положительную идентификацию присутствия генов NS1 или NS2 можно использовать праймеры, специфичные к генам NS1 и/или NS2, в комбинации с праймерами, специфичными к другим частям 3'-конца вирусного генома (таким как нетранслируемая область или ORF для N, M или F). Кроме того, для той же цели можно применять множество способов, таких как молекулярное клонирование и гибридизация нуклеиновой кислоты.

Пример 3. Различные серотипы/подгруппы MPV.

Посредством анализов нуклеотидных последовательностей ORF для N, M, F и L 9 вирусных изолятов выявлены два потенциальных генных кластера. Идентичность нуклеотидов в пределах кластера наблюдали в размере 90-100%, а между подгруппами идентичность наблюдали в пределах 81-88%. Инфор-

мация о последовательности, полученная из большого количества вирусных изолятов, подтвердила существование двух генотипов. Вирусный изолят ned/00/01 как прототип для кластера А и вирусный изолят ned/99/01 как прототип для кластера В использовали для анализов перекрестной нейтрализации для проверки возможной связи генотипов с различными серотипами или подгруппами.

#### Результаты

Применяя анализы RT-PCR с праймерами, расположенными в области гена полимеразы, из образцов назофарингеальных аспираторов авторы настоящего изобретения идентифицировали 30 дополнительных вирусных изолятов. Информация о последовательности частей генов матрикского белка и полимеразы данных новых изолятов, вместе с информацией о последовательности частей генов матрикского белка и полимеразы предыдущих 9 изолятов использовали для конструирования филогенетических деревьев (фиг. 16). Анализы данных деревьев подтвердили наличие двух генетических кластеров, с вирусным изолятом ned/00/01 как прототип для кластера А и вирусным изолятом ned/99/01 как прототип для кластера В. Идентичность нуклеотидной последовательности в пределах групп составляла более чем 92%, тогда как между кластерами идентичность составляла 81-85%.

Вирусные изоляты ned/00/01 и ned/99/01 использовали для инокуляции хорькам с целью активации вирусоспецифических антисывороток. Данные антисыворотки использовали в анализах нейтрализации вируса с обоими вирусами.

Таблица 3. Титры нейтрализации вируса

	Изолят 00-1	Изолят 99-1
Сыворотка хорька до инокуляции А (00-1)	2	2
Хорек А 22 dpi (00-1)	64	2
Сыворотка хорька до инокуляции В (00-1)	2	2
Хорек В 22 dpi (00-1)	4	64

Для изолята 00-1 титр отличается в 32 (64/2) раза.

Для изолята 99-1 титр отличается в 16 (64/4) раз.

Кроме того, по 6 морских свинок инокулировали одним из вирусов (ned/00/01 и ned/99/01). Анализы RT-PCR образцов назофарингеальных аспираторов выявили репликацию вируса со 2 до 10 суток после инфицирования. На 70 сутки после инфицирования у морских свинок провоцировали иммунный ответ как на гомологичный, так и гетерологичный вирус, и для всех четырех случаев отмечена репликация вируса.

Таблица 4

	Первичное инфицирование	Репликация вируса	Вторичное инфицирование	Репликация вируса
Морская свинка 1-3	00-1	2 из 3	99-1	1 из 2
Морская свинка 4-6	00-1	3 из 3	00-1	1 из 3
Морская свинка 7-9	99-1	3 из 3	00-1	2 из 2
Морская свинка 10-12	99-1	3 из 3	99-1	1 из 3

Заметка: морских свинок 2 и 9 не подвергали вторичному инфицированию.

Анализы нейтрализации вируса с антисыворотками после первой провокации иммунного ответа выявили существенно схожие результаты, как и в анализах VN, проводившихся у хорьков (отличие в титре в VN >16 раз).

Результаты, представленные в данном примере, подтверждают существование двух генотипов, соответствующих двум серотипам MPV, и демонстрируют возможность повторного инфицирования гетерологичным и гомологичным вирусами.

Пример 4. Дополнительное определение последовательности.

Данный пример описывает дополнительный анализ последовательностей открытых рамок считывания (ORF) и межгенных последовательностей у MPV, а также неполных последовательностей концов генома.

Анализы последовательностей генов нуклеопротеина (N), фосфопротеина (P), матриксного белка (M) и белка слияния (F) MPV выявляют высочайшую степень гомологии с серотипом С APV, пневмовирусом птиц, первично обнаруженным в Соединенных Штатах. Данные анализы также выявили отсутствие неструктурных белков NS1 и NS2 на 3'-конце вирусного генома и расположение белка слияния непосредственно рядом с матриксным белком. Здесь авторы настоящего изобретения предлагают последовательности генов белка 22K (M2), малого гидрофобного белка (SH), белка прикрепления (G) и белка полимеразы (L), последовательность межгенных областей и концевую последовательность. В комбинации с последовательностями, описанными ранее, последовательности, предлагаемые здесь, завершают последовательность генома MPV, за исключением крайних 12-15 нуклеотидов концов генома и определяют геномную организацию MPV. Попарное сравнение последовательностей генома MPV с последовательностями геномов подтипов А, В и С APV, подтипов А и В RSV, PVM и других парамиксовирусов представляет веское доказательство систематизации MPV в род Metapneumovirus.

## Результаты

### Стратегия определения последовательности

Изолят MPV 00-1 (van den Hoogen et al., 2001) размножали в третичных клетках почки обезьяны (tMK), а РНК выделяли из супернатанта на 3 неделе после инокуляции и использовали как матрицу для анализов RT-PCR. Праймеры подобрали на основании информации о частичной последовательности, доступной для MPV 00-1 (van den Hoogen et al., 2001), а также лидерной и концевой последовательностей APV и RSV (Randhawa et al., 1997; Mink et al., 1991). Исходно, посредством амплификации RT-PCR, получили фрагменты между ранее полученными продуктами, в диапазоне длин от 500 п.н. до 4 т.п.н. и точно определили последовательность. Геномную последовательность впоследствии подтвердили посредством получения серии перекрывающихся фрагментов RT-PCR в диапазоне от 500 до 800 п.н., представляющих весь геном MPV. Для минимизации ошибок амплификации и определения последовательности у всех фрагментов PCR определяли точную последовательность обеих цепей. Нуклеотидную и аминокислотную последовательности применяли для поиска гомологии последовательности в базе данных Genbank с применением программного обеспечения BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Названия белкам приписывали открытым рамкам считывания (ORF), основываясь на гомологии с известными вирусными генами, а также на их положении в геноме. Основываясь на данной информации, создали геномную карту MPV (фиг. 7). Геном MPV состоит из 13378 нуклеотидов и его организация подобна геномной организации APV. Ниже авторы настоящего изобретения представляют сравнение ORF и некодирующих последовательностей MPV и ORF и некодирующих последовательностей других парамиксовирусов и обсуждают основные сходства и отличия.

### Ген нуклеопротеина (N)

Как показано, первый ген на геномной карте MPV кодирует белок из 394 аминокислот и обладает большой гомологией с белком N других парамиксовирусов. Длина ORF для N идентична длине ORF для N у APV-C (табл. 5) и меньше чем длина ORF для N других пневмовирусов (Barr et al., 1991). Анализ аминокислотной последовательности выявил высочайшую гомологию с APV-C (88%) и только 7-11% с другими парамиксовирусами (табл. 6).

Barr et al. (1991) идентифицировали 3 области сходства между вирусами, принадлежащими к порядку Mononegavirales: А, В и С (фиг. 8). Хотя сходство наиболее высоко в пределах вирусного семейства, в различных семействах вирусов данные области являются высоко консервативными. Во всех трех областях MPV выявлена идентичность аминокислот в размере 97% с APV-C, 89% - с APV-B, 92% - с APV-A и 66-73% - с RSV и PVM. Область между аминокислотными остатками 160 и 340 оказывается высоко консервативной у метапневмовирусов и, несколько в меньшей степени, у Pneumovirinae (Miayahara et al., 1992; Li et al., 1996; Barr et al., 1991). Данная конкретная область, обнаруживающая 100% сходства с APV-C, находится в согласии с тем, что MPV представляет собой метапневмовирус.

### Ген фосфопротеина (P).

Вторая ORF геномной карты кодирует белок из 294 аминокислот, проявляющий гомологию по последовательности в размере 68% аминокислот с белком Р APV-C и только 22-26% с белком Р RSV (табл. 6). Ген Р MPV содержит одну дополнительную ORF и в этом отношении подобен генам Р многих других парамиксовирусов (рассмотрено у Lamb and Kolakofsky, 1996; Sedlmeier et al., 1998).

В противоположность APV-A и -B и PVM и подобно RSV и APV-C в ORF для Р у MPV отсутствуют остатки цистеина. Ling (1995) предположил, что область высокого подобия у всех пневмовирусов (аминокислоты 185-241) играет роль или в процессе синтеза РНК или поддержании структурной целостности нуклеокапсидного комплекса. Данная область высокого подобия также обнаружена у MPV (фиг. 9), конкретно, когда в расчет берут консервативные замены, демонстрируя 100% подобия с APV-C, 93% с APV-A и В и примерно 81% с RSV. С-конец белка Р MPV богат глутаминовыми остатками, как описано у вирусов APV (Ling et al., 1995).

### Ген матриксного белка (M)

Третья ORF в геноме MPV кодирует белок из 254 аминокислот, соответствующий ORF других пневмовирусов. ORF для M у MPV обладает в точности таким же размером как ORF для M других пневмовирусов (табл. 5) и обладает значительной гомологией с матриксными белками APV (78-87%), мень-

шей гомологией с матриксными белками RSV и PVM (37-38%) и гомологией в размере 10% или менее с матриксными белками других пневмовирусов (таблица 6).

Easton (1997) сравнил последовательности матриксных белков всех пневмовирусов и обнаружил консервативный гексапептид из остатков с 14 по 19, который также консервативен у MPV (фиг. 10). Для RSV, PVM и APV идентифицированы малые вторичные ORF в пределах главной ORF для M или перекрывающиеся с ней (52 аминокислоты и 51 аминокислота у bRSV, 75 аминокислот у RSV, 46 аминокислот у PVM и 51 аминокислота у APV) (Yu et al., 1992; Easton et al., 1997; Samal et al., 1991; Satake et al., 1984). Авторы настоящего изобретения заметили две малых ORF в ORF для M у MPV. Одну малую ORF из 53 аминокислотных остатков обнаружили в пределах главной ORF для M (фрагмент 1, фиг. 7), начиная от нуклеотида 2281, а другую малую ORF из 33 аминокислотных остатков обнаружили перекрывающуюся с главной ORF для M, начиная с нуклеотида 2893 (фрагмент 2, фиг. 7). Подобно вторичным ORF RSV и APV значимой гомологии вторичных ORF с вторичными ORF других пневмовирусов не обнаружено, а также отсутствуют видимые сигналы начала и окончания транскрипции. Кроме того, доказательства синтеза белков, соответствующих данным вторичным ORF APV и RSV, отсутствуют.

#### Ген белка слияния (F)

ОРФ для F у MPV расположена рядом с ORF для M, что характерно для представителей рода *Metapneumovirus*. Ген F у MPV кодирует белок из 539 аминокислот, что на два аминокислотных остатка больше чем F у APV-C (табл. 5). Анализ аминокислотной последовательности выявил 81% гомологии с APV-C, 67% с APV-A и B, 33-39% с белками F пневмовирусов и только 10-18% с другими парамиксовирусами (табл. 6). Одним из консервативных признаков у белков F парамиксовирусов, которую также наблюдали у MPV, является расположение цистеиновых остатков (Morrison, 1988; Yu et al., 1991). Метапневмовирусы обладают 12 остатками цистеина в F1 (7 являются консервативными у всех парамиксовирусов) и двумя в F2 (1 является консервативным у всех парамиксовирусов). Из 3 возможных участков N-связанного гликозилирования, представленных в ORF для F у MPV, ни один не является общим с RSV и два (позиции 74 и 389) являются общими с APV. Третий, уникальный, участок возможного W-связанного гликозилирования расположен в позиции 206 (фиг. 11).

Несмотря на низкую гомологию последовательности с другими парамиксовирусами, белок F MPV обнаруживает типичные характеристики белка слияния, согласующиеся с характеристиками, описанными для белков F других представителей семейства *Paramyxoviridae* (Morrison, 1988). Белки F представителей *Paramyxoviridae* синтезируются в виде неактивных предшественников (F0), расщепляемых посредством протеаз клетки-хозяина, образующих N-концевые субъединицы F2 и большие C-концевые субъединицы F1. Предполагаемый участок расщепления (Collins et al., 1996) консервативен у всех представителей семейства *Paramyxoviridae*. Участок расщепления у MPV содержит остатки RQSR. Оба аргининовых (R) остатка являются общими с APV и RSV, но глутаминовый (Q) и сериновый (S) остатки являются общими с другими парамиксовирусами, такими как вирус парагриппа человека типа 1, вирус Сендей и морбиливирусы (данные не показаны).

Полагают, что N-концевая гидрофобная область F1 функционирует как мембранный домен слияния и показывает высокое сходство последовательности у парамиксовирусов и морбиливирусов и, в меньшей степени, у пневмовирусов (Morrison, 1988). Данные 26 остатков (позиции 137-163, фиг. 11) консервативны у MPV и APV-C, что является в согласии с тем, что данная область является высоко консервативной у метапневмовирусов (Naylor et al., 1998; Seal et al., 2000).

Как видно для субъединиц F2 у APV и других парамиксовирусов, MPV обнаруживает делецию 22 аминокислотных остатков в сравнении с RSV (позиции 107-128, фиг. 11). Более того, для RSV и APV, обнаружено, что сигнальный пептид и якорный домен являются консервативными в пределах подтипов и высоко вариабельны между подтипами (Plows et al., 1995; Naylor et al., 1998). Сигнальный пептид MPV (аминокислоты 10-35, фиг. 11) на N-конце F2 демонстрирует некоторое сходство с последовательностью с APV-C (18 из 26 аминокислотных остатков являются сходными) и меньшую консервативность с другими видами APV или RSV. Гораздо большую вариабельность наблюдают в мембранным якорном домене на карбоксильном конце F1, хотя некоторая гомология с APV-C еще видна.

#### Белок 22К (M2)

Ген M2 унекален для *Pneumovirinae* и для всех пневмовирусов наблюдали две перекрывающиеся ORF. Первая главная ORF соответствует белку M2-1, который усиливает процессивность вирусной полимеразы (Collins et al., 1995; Collins, 1996) и прохождение ее межгенных областей (Hardy et al., 1998; Fearn et al., 1999). Ген M2-1 у MPV, расположенный рядом с геном F, кодирует белок из 187 аминокислот (табл. 5) и обнаруживает наивысшую (84%) гомологию с M2-1 у APV-C (табл. 6). Сравнение всех пневмовирусных белков M2-1 выявило наибольшую консервативность N-концевых частей белка (Collins et al., 1990; Zamora et al., 1992; Ahmadian et al., 1999), что находится в согласии с наблюдением, что MPV обнаруживает 100% сходство с APV-C первых 80 аминокислотных остатков белка (фиг. 12А). Белок M2-1 у MPV содержит 3 цистеиновых остатка, расположенных в пределах первых 30 аминокислотных остатков, что является консервативным у всех пневмовирусов. Такая концентрация цистеиновых остатков часто обнаруживается у связывающих цинк белков (Ahmadian et al., 1991; Cuesta et al., 2000).

Вторичные ORF (M2-2), перекрывающиеся с M2-1 ORF пневмовирусов, являются консервативными по расположению, но не по последовательности, и, как считается, вовлечены в контроль переключения между репликацией вирусной РНК и транскрипцией (Collins et al., 1985; Elango et al., 1985; Baybutt et al., 1987; Collins et al., 1990; Ling et al., 1992; Zamora et al., 1992; Alansari et al., 1994; Ahmadian et al., 1999; Bermingham et al., 1999). У MPV ORF для M2-2 начинается с 512 нуклеотида ORF для M2-1 (фиг. 7), что является точно такой же стартовой позицией, как у APV-C. Длины ORF для M2-2 являются одинаковыми для APV-C и MPV и составляют 71 аминокислотный остаток (табл. 5). Сравнение последовательности ORF для M2-2 (фиг. 12B) выявило 64% гомологию аминокислотных последовательностей у MPV и APV-C и только 44-48% гомологию аминокислотных последовательностей у MPV и APV-A и B (табл. 6).

#### ORF малого гидрофобного белка (SH)

Ген, располагающийся рядом с M2 у hMPV, возможно кодирует белок SH из 183 аминокислот (фиг. 1 и 7). Видимой идентичности последовательности у данной ORF с другими вирусными генами или продуктами генов РНК не обнаружено. Это не является неожиданным, так как сходство последовательностей у белков SH пневмовирусов, как правило, невелико. Предполагаемая ORF для SH у hMPV является длиннейшей ORF для SH, известной до настоящего времени (табл. 1). Аминокислотный состав ORF для SH относительно схож с аминокислотным составом APV, RSV и PVM с высоким процентом содержания остатков треонина и серина (22%, 18%, 19%, 20,0%, 21% и 28% у hMPV, APV, RSV A, RSV B, bRSV and PVM, соответственно). ORF для SH у MPV содержит 10 цистeinовых остатков, тогда как SH у APV содержит 16 цистeinовых остатков. ORF для SH у MPV обладает двумя участками возможного N-связанного гликозилирования (аминокислоты 76 и 121), тогда как APV - одним, RSV - двумя или тремя и PVM - четырьмя.

Профили гидрофобности предполагаемого белка SH у hMPV, и SH у APV и RSV выявили одинаковые структурные особенности (фиг. 7B). ORF для SH у APV и у hMPV обладают гидрофильным N-концом, центральным гидрофобным доменом, который может служить в качестве возможного трансмембранных домена (аминокислоты 30-53 для hMPV), вторым гидрофобным доменом (аминокислоты 155-170) и гидрофильным C-концом. Напротив, в SH у RSV обнаружено отсутствие C-концевой части ORF из APV и MPV. У всех пневмовирусов гидрофобные домены белков SH фланкируются основными аминокислотными остатками, которые также обнаружены в ORF для SH у hMPV (аминокислоты 29 и 54).

#### ORF гликопротеина прикрепления (G)

ORF для G у hMPV расположена рядом с геном SH и кодирует белок из 236 аминокислот (нуклеотиды 6262-6972, фиг. 1). Обнаруженная вторичная малая ORF, расположенная непосредственно вслед за данной ORF, потенциально кодирует 68 аминокислотных остатков (нуклеотиды 6973-7179), но у нее отсутствует стартовый кодон. Третья возможная ORF во второй рамке считываия из 194 аминокислотных остатков перекрываетя с обеими из данных ORF, но также не обладает стартовым кодоном (нуклеотиды 6416-7000). Данная ORF, следующая за возможной четвертой ORF в той же рамке считываия, состоящая из 65 аминокислотных остатков (нуклеотиды 7001-7198), снова не обладает стартовым кодоном. Наконец, в третьей рамке считываия (нуклеотиды 6444-6737, фиг. 1) обнаружена потенциальная ORF из 97 аминокислотных остатков (но не обладающая стартовым кодоном). В отличие от первой ORF, другие ORF не имеют видимых последовательностей начала или конца гена (см. ниже). Хотя 236 аминокислотных остатков ORF для G, вероятно, представляют по меньшей мере часть белка прикрепления hMPV, нельзя исключить, что дополнительные кодирующие последовательности экспрессируются в виде отдельных белков или как часть белка прикрепления вследствие некоторого события, изменяющего РНК. Следует заметить, что у APV и RSV не идентифицировали вторичных ORF после первичной ORF для G, но и APV и RSV обладают вторичными ORF в пределах главной ORF для G. Однако доказательство экспрессии этих ORF отсутствует, а также не существует гомологии расчетной аминокислотной последовательности у различных вирусов (Ling et al., 1992). Во вторичных ORF для G у hMPV не обнаружили особенностей других белков G, а чтобы выяснить, экспрессируются ли дополнительные ORF, нужно провести дополнительные исследования.

Анализ BLAST со всеми ORF не выявил заметной гомологии с другими известными вирусными генами или продуктами генов на уровнях нуклеотидов или аминокислотной последовательности. Это согласуется с низкими процентами гомологии последовательности, найденными для других белков G, таких как hRSV A и B (53%) (Johnson et al., 1987) и APV A и B (38%) (Juhasz and Easton, 1994).

Тогда как большинство ORF у hMPV имеют сходство с ORF у APV как по длине, так и по последовательности, возможная ORF для G из 236 аминокислотных остатков значительно меньше, чем ORF для G у APV (табл. 1). Аминокислотная последовательность обнаруживает содержание серина и треонина в размере 34%, что даже выше, чем 32% у RSV и 24% у APV. Возможная ORF для G также содержит 8,5% пролиновых остатков, что выше, чем 8% у RSV и 7% у APV. Необычное изобилие пролиновых остатков в белках G у APV, RSV и MPV также наблюдали у гликопротеинов слизистого происхождения, где они являлись главной детерминантой третичной структуры белков (Collins and Wertz, 1983; Wertz et al., 1985; Jentoft, 1990). ORF для G у hMPV содержит пять потенциальных участков N-связанного гликозилирования, тогда как у hRSV их 7, у bRSV - 5 и у APV - от 3 до 5.

Предсказанный профиль гидрофобности G у MPV выявил особенности, сходные с другими пневмовирусами. N-концы содержат гидрофильную область, за которой следует короткая гидрофобная зона (аминокислоты 33-53 для hMPV) и преимущественно гидрофильный карбоксильный конец (фиг. 14В). Такая общая организация согласуется с организацией заякоренных трансмембранных белков II типа и хорошо соответствует данным областям белков G у APV и RSV. Возможная ORF для G у hMPV содержит только 1 цистeinовый остаток, в отличие от RSV и APV (5 и 20 соответственно). Известно, что только две из четырех вторичных ORF в гене G содержат один дополнительный цистeinовый остаток и что данные четыре возможных ORF содержат 12-20% сериновых и треониновых и 6-11% пролиновых остатков.

### Ген полимеразы (L)

Аналогично другим вирусам с "минус"-цепью, последняя ORF генома MPV является компонентом РНК-зависимой РНК полимеразы комплексов репликации и транскрипции. Ген L у MPV кодирует белок из 2005 аминокислот, который на 1 остаток длиннее, чем данный белок у APV-A (табл. 5). Белок L у MPV проявляет гомологию по последовательности в размере 64% с APV-A, 42-44% - с RSV и приблизительно 13% с другими парамиксовирусами (табл. 6). Poch et al. (1989; 1990) идентифицировали шесть консервативных доменов в белках L несегментированных РНК-вирусов с "минус"-цепью, из которых домен III включает четыре мотива ядра полимеразы, которые, как считается, являются основными для функционирования полимеразы. Данные мотивы (A, B, C и D) являются в высокой степени консервативными в белке L у MPV: по мотивам A, B и C MPV обладает 100% сходством со всеми пневмовирусами, а по мотиву D MPV обладает 100% сходством с APV и 92% - с вирусами RSV. Для целого домена III (аминокислоты 627-903 в ORF для L) MPV обладает гомологией с APV в размере 77%, с RSV - 61-62% и с другими парамиксовирусами - 23-27% (фиг. 15). В дополнение к мотивам полимеразы, белки L пневмовирусов содержат последовательность, соответствующую консенсусному АТФ-связывающему мотиву K(X)<sub>21</sub>GEGAGN(X)<sub>20</sub>K (Stec, 1991). ORF для L у MPV содержит подобно APV мотив, в котором размещение промежуточных остатков сдвинуто на один: K(X)<sub>22</sub>GEGAGN(X)<sub>19</sub>K.

### Филогенетические анализы

Как показатель родства MPV с представителями Pneumovirinae, ранее, основываясь на ORF для N, P, M и F, сконструировали филогенетические деревья, которые выявили близкое родство MPV с APV-C. Ввиду низкой гомологии генов G и SH у MPV с другими пневмовирусами построить достоверные филогенетические деревьев для данных генов не представлялось возможным. Кроме того, различная организация генома у представителей родов *Pneumovirus* и *Metapneumovirus* сделала невозможной создание филогенетических деревьев на основе последовательности целого генома. Поэтому, в дополнение к ранее опубликованным, авторы настоящего изобретения построили филогенетические деревья только для генов M2 и L. Оба эти дерева подтвердили близкое родство APV и MPV в пределах подсемейства Pneumovirinae (фиг. 16).

### Некодирующие последовательности MPV

Генные контакты генома парамиксовирусов содержат короткие и высококонсервативные последовательности нуклеотидов на начале и конце каждого гена (сигналы начала и конца гена), возможно играющие роль в инициации и терминации транскрипции (Cirigli et al., 1999). Сравнение межгенных последовательностей всех генов MPV выявило консенсусную последовательность сигнала старта гена для N, P, M, F, M2 и G: GGGACAAGU (фигура 17а), которая идентична для консенсусного сигнала старта гена у метапневмовирусов (Ling et al., 1992; Yu et al., 1992; Li et al., 1996; Bayon-Auboyer et al., 2000). Обнаружено, что сигналы старта гена для генов SH и L у MPV немного отличаются от консенсусного (SH: GGGAUAAA, L: GAGACAAA). Обнаружено, что сигнал старта гена для L у APV также отличается от консенсусного: AGGACCAAT (APV-A) (Randhawa et al., 1996) и GGGACCAGT (APV-D) (Bayon-Auboyer et al., 2000).

В противоположность схожим последовательностям старта гена у MPV и APV, в межгенных последовательностях MPV не удалось обнаружить консенсусную последовательность конца гена у APV, UAGUUAAU (Randhawa et al., 1996). Повторяющейся последовательностью, которую нашли во многих генах, исключая межгенные области G-L, и которая, возможно, могла бы действовать в качестве сигнала конца гена, являлась U AAAAU U/A/C. Однако так как авторы настоящего изобретения определяли последовательность вирусной РНК раньше, чем последовательность мРНК, определенные сигналы конца гена определить не удалось и, таким образом, необходимы дальнейшие исследования. Межгенные области пневмовирусов изменяются по размеру и последовательности (Cirigli et al., 1999; Blumberg et al., 1991; Collins et al., 1983). Межгенные области у MPV не обнаруживают гомологий с межгennыми областями APV и RSV и их размер находится в диапазоне от 10 до 228 нуклеотидов (фиг. 17В). Межгенная область между ORF для M и F у MPV содержит часть вторичной ORF, которая начинается в первичной ORF для M (см. выше). Межгенная область между SH и G содержит 192 нуклеотида, и, основываясь на присутствии многочисленных терминирующих кодонов во всех трех рамках считывания, не обнаруживает возможности кодирования. Межгенная область между G и L содержит 241 нуклеотид и может включать дополнительные ORF (см. выше). Интересно, что старт ORF для L расположен в данных вторичных ORF. Поскольку ген L у APV не начинается в предшествующей ORF для G, ORF для L у RSV также начинает-

ся в предшествующем гене M2. На 3'-конце и 5'-конце генома парамиксовирусов короткая внегенная область, относящаяся к лидерным и концевым последовательностям, и примерно первые 12 лидерных и 12 концевых нуклеотидов комплементарны, вероятно, из-за того, что каждый содержит основные элементы вирусного промотора (Curran et al., 1999; Blumberg et al., 1991; Mink et al., 1986). 3'- лидерная последовательность и у MPV, и у APV составляет 41 нуклеотид в длину, и в области между нуклеотидами 16 и 41 наблюдаются некоторую гомологию обоих вирусов (18 из 26 нуклеотидов) (фиг. 17В). Как упоминалось ранее, первые 15 нуклеотидов геномной карты MPV основываются на последовательности праймеров, на основе генома APV. Длина 5'-конца у MPV (188 нуклеотидов) сходна с размером 5'-конца у RSV (155 нуклеотидов), который существенно больше, чем у APV (40 нуклеотидов). Выравнивание 40 крайних нуклеотидов конца MPV и конца APV выявило гомологию 21 из 32, не считая крайних 12 нуклеотидов, представляющих последовательности праймеров, основывающихся на геномной последовательности APV. Анализы последовательности авторами настоящего изобретения выявили отсутствие генов NS1 и NS2 на 3'-конце генома, и геномная организация подобна организации метапневмовирусов (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'). Высокая гомология последовательности, обнаруженная у родов MPV и APV дополнительно акцентирует близкое родство данных двух вирусов. Для генов N, P, M, F, M2-1 и M2-2 у MPV обнаружена общая гомология аминокислот с APV-C в размере 79%. Фактически, для этих генов APV-C и MPV обнаруживают гомологии последовательности, которые находятся в том же диапазоне, что и гомологии последовательности, обнаруженные у подгрупп других родов, таких как RSV-A и -B или APV-A и -B. Данное близкое родство APV-C с MPV также видят при филогенетических анализах, которые выявляют, что APV-C и MPV всегда находится на одной ветви, отдельно от ветви, содержащей APV-A и -B. Идентичная геномная организация, гомологии последовательности и филогенетические анализы - все свидетельствуют в пользу классификации MPV как первого представителя рода *Metapneumovirus*, выделяемого из млекопитающих. Необходимо отметить, что обнаруженные изменения последовательности у различных вирусных изолятов MPV в генах N, M, F и L выявляют возможное существование различных генотипов (van den Hoogen et al., 2001). Близкое родство между MPV и APV-C не отражается на ряде хозяев, так как APV заражает птиц, в противоположность MPV (van den Hoogen et al., 2001). Данную разницу в ряде хозяев могут определять различия между высоко дивергентными белками SH и G обоих вирусов. Белки SH и G у MPV не обнаруживаются значимой гомологией аминокислотной последовательности с белками SH и G любого другого вируса. Хотя содержание аминокислот и графики гидрофобности свидетельствуют в пользу определения данных ORF как SH и G, для оценки их функции необходимы экспериментальные данные. Такие анализы проливают свет на роль дополнительных перекрывающихся ORF в данных генах SH и G. Кроме того, анализы последовательности генов SH и G у APV-C могут представить большее понимание о функциях белков SH и G у MPV и их родства с белками SH и G у APV-C. Обнаружено, что некодирующие области MPV являются довольно сходными с некодирующими областями APV. 3'-лидерная и 5'-концевая последовательности APV и MPV обнаруживают высокую степень гомологии. Хотя длины межгенных областей у APV и MPV не всегда одинаковы, консенсусные сигналы старта гена для большинства найденных ORF идентичны. В противоположность этому, сигналы конца гена APV в геноме у MPV не обнаружены. Хотя авторы настоящего изобретения обнаружили повторяющуюся последовательность (U AAAA U/A/C) в большинстве межгенных областей, необходим анализ последовательности вирусных мРНК для формального установления данных последовательностей конца гена. Необходимо отметить, что информация о последовательности для 15 нуклеотидов на крайнем 3'-конце и 12 нуклеотидах на крайнем 5'-конце получена посредством применения способов модифицированной быстрой амплификации концов кДНК (RACE). Доказано, что данный способ для родственных вирусов является более успешным по сравнению с другими (Randhawa, J.S. et al. Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J. Virol.*, 71, 9849-9854 (1997); Mink, M.A., et al. Nucleotide sequences of the 3'leader and 5'trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24 (1991)). Для определения последовательности 3'-лидерной последовательности вРНК, очищенной вРНК, с использованием поли-А-полимеразы, добавили концевой гомополимер А, а потом лидерную последовательность амплифицировали посредством PCR с применением праймера поли-Т и праймера в гене N. Для определения последовательности 5'-конца вРНК, с применением обратной транскриптазы и праймера в гене L, получили кДНК-копию концевой последовательности, с последующим добавлением dG-гомополимера к концу кДНК посредством терминальной трансферазы. Далее, концевую область амплифицировали с применением праймера поли-С и праймера в гене L. В качестве альтернативной стратегии, вРНК лигируют саму с собой или синтетическими линкерами, после чего лидерная и концевая области амплифицируют с применением праймеров в генах L и N и праймеров, специфичных к линкеру. Для 5'-концевой последовательности также осуществляется прямое определение последовательности очищенной вРНК с дидезоксинуклеотидами (Randhawa, 1997). Применяя данные подходы, авторы настоящего изобретения могут анализировать точную последовательность концов генома hMPV. Информация о последовательности, представленная здесь, является важной для создания диагностических тестов, вакцин и противовирусных препаратов для MPV и инфекций MPV.

## Материалы и методы

### Анализы последовательностей

Вирусный изолят 00-1 размножали до высоких титров (приблизительно 10000 TCID50/мл) в третичных клетках почки обезьяны, как описано ранее (van den Hoogen et al., 2001). Вирусную ДНК выделяли из супернатанта инфицированных клеток, используя High Pure RNA Isolating Kit согласно инструкциям изготовителя (Roch Diagnostics, Almere, The Netherlands). Праймеры подбирали, основываясь на ранее опубликованных последовательностях (van den Hoogen et al., 2001) дополнительно к последовательностям, опубликованным для лидерной и концевой последовательностей APV/RSV (Randhawa et al., 1997; Mink et al., 1991), и они находились в распоряжении по требованию. С вирусной РНК проводили анализы RT-PCR, применения анализ в одной пробирке общим объемом 50 мкл, содержащей 50 мМ Tris с pH 8,5, 50 мМ NaCl, 4,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ DTT, 1 мКМ прямого праймера, 1 мКМ обратного праймера, 0,6 мМ dNTP, 20 единиц RNAsin (Promega, Leiden, The Netherlands), 10 единиц обратной транскриптазы AMV (Promega, Leiden, The Netherlands) и 5 единиц Taq-полимеразы (PE Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands). Обратную транскрипцию проводили 30 мин при 42°C, с последующей инактивацией в течение 8 мин при 95°C. кДНК амплифицировали в течение 40 циклов: 1 мин - 95°C, 2 мин - 42°C, 3 мин - 72°C, с заключительной дестройкой при 72°C 10 мин. После проверки в 1% агарозном геле продукты RT-PCR очищали из геля с использованием набора Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Leusden, The Netherlands) и определяли последовательность прямым способом с использованием набора Dyenamic ET terminator sequencing (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, the Netherlands) и автоматического секвенатора ДНК ABI 373 (PE Applied Biosystem, Nieuwerkerk aan den IJssel, the Netherlands), по инструкциям производителя.

Выравнивание последовательности проводили с применением программного пакета Clustal, доступного в программном пакете BioEdit версии 5.0.6. (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>; Hall, 1999).

### Филогенетический анализ

Для построения филогенетических деревьев, последовательности ДНК выравнивали с применением программного пакета ClustalW, а деревья максимального правдоподобия получали с применением программного пакета DNA-ML программы Phylip 3.5, с применением 100 условий инициализации и 3 перестановок. Величины условий инициализации вычисляли для консенсусных деревьев, созданных с консенсусной упаковкой (Felsenstein, 1989).

Геномная последовательность MPV доступна в Genbank под номером доступа AF371337. Все другие последовательности, используемые здесь, доступны в Genbank под номерами доступа AB046218 (вирус кори, все ORF), NC001796 (вирус парагриппа человека 3 типа, все ORF), NC-001552 (вирус Сендей, все ORF), X57559 (вирус парагриппа человека 2 типа, все ORF), NC-002617 (вирус болезни Ньюкасла, все ORF), NC-002728 (вирус Nipah, все ORF), NC-001989 (bRSV, все ORF), M11486 (hRSV A, все ORF, исключая L), NC-001803 (hRSV, L для ORF), NC-001781 (hRSV B, все ORF), D10331 (PVM, N ORF), U09649 (PVM, P ORF), U66893 (PVM, M ORF), U66893 (PVM, SH ORF), D11130 (PVM, G ORF), D11128 (F ORF), PVM M2 ORF получена из Ahmadian (1999), AF176590 (APV-C, N ORF), U39295 (APV-A, N ORF), U39296 (APV-B, N ORF), AF262571 (APV-C, M ORF), U37586 (APV-B, M ORF), X58639 (APV-A, M ORF), AF176591 (APV-C, P ORF), AF325443 (APV-B, P ORF), U22110 (APV-A, P ORF), AF187152 (APV-C, F ORF), Y14292 (APV-B, F ORF), D00850 (APV-A, F ORF), AF176592 (APV-C, M2 ORF), AF35650 (APV-B, M2 ORF), X63408 (APV-A, M2 ORF), U65312 (APV-A, L ORF), S40185 (APV-A, SH ORF).

Таблица 5. Длины ORF у MPV и других парамиксовирусов

	N <sup>1</sup>	P	M	F	M2-1	M2-2	SH	G	L
MPV	394	294	254	539	187	71	183	236	2005
APV A	391	278	254	538	186	73	174	391	2004
APV B	391	279	254	538	186	73	- <sup>2</sup>	414	- <sup>2</sup>
APV C	394	294	254	537	184	71	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
APV D	- <sup>2</sup>	389	- <sup>2</sup>						
hRSV A	391	241	256	574	194	90	64	298	2165
hRSV B	391	241	249	574	195	93	65	299	2166
bRSV	391	241	256	569	186	93	81	257	2162
PVM	393	295	257	537	176	77	92	396	- <sup>2</sup>
Другие <sup>3</sup>	418- 542	225- 709	335- 393	539- 565	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	2183- 2262

Сноски:

1. Протяженность в аминокислотных остатках.
2. Последовательность недоступна.
3. Другие: вирус парагриппа человека типов 2 и 3, вирус Сендай, вирус кори, вирус Nipah, вирус чумки тюленей и вирус болезни Ньюкасла.
4. ORF не присутствует в геноме вируса.

Таблица 6. Идентичность аминокислотной последовательности для ORF у MPV и ORF других парамиксовирусов<sup>1</sup>

	N	P	M	F	M2-1	M2-2	L
APV A	69	55	78	67	72	26	64
APV B	69	51	76	67	71	27	- <sup>2</sup>
APV C	88	68	87	81	84	56	- <sup>2</sup>
hRSV A	42	24	38	34	36	18	42
hRSV B	41	23	37	33	35	19	44
bRSV	42	22	38	34	35	13	44
PVM	45	26	37	39	33	12	- <sup>2</sup>
Другие <sup>3</sup>	7-11	4-9	7-10	10-18	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	13-14

Сноски:

1. Не найдено гомологии последовательности с известными белками G и SH и, таким образом, исключено.
2. Последовательность недоступна.
3. См. список в таблице 5, сноска 3.
4. ORF отсутствует в геноме вируса.

## Ссылки

- Current Protocols in Molecular Biology, volume 1-3 (1994-1998). Ed. by Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl K. Published by John Wiley and sons, Inc., USA.
- Current Protocols in Immunology, volume 1-3. Ed. by Coligan, J.E., Kruisbeek, AM., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W. Published by John Wiley and sons, Inc., USA.
- Sambrook et al. Molecular cloning, a laboratory manual, second ed., vol. 1-3. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).
- Fields, Virology. 1996. Vol. 1-2 3rd. Edition , Ed. by: Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.
1. Pringle, C.R. Virus taxonomy at the Xth international congress of virology, Sydney, Australia 1999. Arch. Virol. 144/2, 2065-2070 (1999).
  2. Domachowske, J.B. & Rosenberg, H.F. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. Clin. Microbiol. Rev. 12(2), 298-309 (1999). Review.
  3. Giraud, P., Bennejean, G., Guittet, M. & Toquin, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. Vet. Rec. 119, 606-607 (1986).
  4. Ling, R., Easton, A. J. & Pringle, C.R. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. J. Gen. Virol. 73, 1709-1715 (1992).
  5. Yu, Q., Davis, P. J., Li, J. & Cavanagh, D. Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. Virology 186, 426-434 (1992).
  6. Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R. & Easton, A.J. Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. J. Virol. 71, 9849-9854 (1997).
  7. Evans, A.S. In: Viral Infections of Humans. Epidemiology and control. 3th edn. (ed. Evans, A.S) 22-28 (Plenum Publishing Corporation, New York, 1989).
  8. Osterhaus, A.D.M.E., Yang, H., Spijkers, H.E.M., Groen, J., Teppema, J.S. & van Steenis, G. The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the Harbor Seal (*Phoca vitulina*). Arch. of Virol. 86, 239-251 (1985).
  9. K.B. Chua et al. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. Science 288, 1432-1435 (2000).
  10. Welsh, J., Chada, K., Dalai, S.S., Cheng, R., Ralph, D. & McClelland, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. NAR. 20, 4965-4970 (1992).
  11. Bayon-Auboyer, M., Arnauld, C., Toquin, D. & Eterradoissi, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. J. of Gen. Virol. 81, 2723-2733 (2000).
  12. Mulder, J. & Masurel, N. Pre-epidemic antibody against 1957 strain of asiatic influenza in serum of older people living in The Netherlands. The Lancet, april 19, 810-814 (1958).
  13. Pringle, C.R. In: The Paramyxoviruses. 1th edn.(ed. D.W. Kingsbury) 1-39 ( Plenum Press, New York, 1991).
  14. Rothbarth, P.H., Groen, J., Bohnen, A.M., Groot, de R., & Osterhaus, A.D.M.E. Influenza virus serology-a comparative study. J.of Virol. Methods 78, 163-169 (1999).
  15. Brandenburg, A.H., Groen, J., van Steensel-Moll, H.A., Claas, E.J.C., Rothbarth, P.H., Neijens, H. J. & Osterhaus, A.D.M.E. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. J.Med.Virol. 52, 97-104 (1997).
  16. Lennette, D.A. et al. In: Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. 7th edn. (eds. Lennette, E.H., Lennette, D.A. & Lennette, E.T.) 3-25; 37-138; 431-463; 481-494; 539-563 (American public health association, Washington, 1995).
  15. Felsenstein, J. Department of Genetics, University of Washington. [Http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html](http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html)
  16. Schnell et al EMBO J 13, 4195-4203, 1994
  17. Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M. & Murphy, B.R. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. PNAS 92, 11663-11567 (1995).
  18. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawakao, Y., Hobom, G. & Webster, R.G. A DNA transfection system for generation of influenza virus from eight plasmids. PNAS 97, 6108-6113 (2000).
  19. Bridgen, A., Elliot, R.M. Rescue of a segmented negative-strand virus entirely from cloned complementary DNAs. PNAS 93, 15400-15404 (1996).
  20. Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O.G., Pleschka, S. & Garcia-Sastre, A. Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. PNAS 93, 11354-11358 (1996).

21. Peeters, B.P., de Leeuw, O.S., Koch, G. & Gielkens, A.L. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* 73, 5001-5009 (1999).
22. Durbin, A.P., Hall, S.L., Siew, J.W., Whitehead, S.S., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. *Virology* 235, 323-332 (1997).
23. Tao, T., Durbin, A.P., Whitehead, S.S., Davoodi, F., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Recovery of a fully viable chimeric human parainfluenza virus (PIV) type 3 in which the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins have been replaced by those of PIV type 1. *J. Virol.* 72, 2955-2961 (1998).
24. Durbin, A.P., Skiadopoulos, M.H., McAuliffe, J.M., Riggs, J.M., Surman, S.R., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Human parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the hemagglutinin protein of measles virus provides a potential method for immunization against measles virus and RSV in early infancy. *J. Virol.* 74, 6821-6831 (2000).
25. Skiadopoulos, M.H., Durbin, A.P., Tatem, J.M., Wu, S.L., Paschal, M., Tao, T., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Three amino acid substitutions in the L protein of the human parainfluenza virus type 3 cp45 live attenuated vaccine candidate contribute to its temperature-sensitive and attenuation phenotypes. *J. Virol.* 72, 1762-1768 (1998).
26. Teng, N., Whitehead, S.S., Birmingham, A., St.Claire, M., Elkins, W.R., Murphy, B.R. & Collins, P.L. *J. Virol.* 74, 9317-9321 (2000).
27. Masurel, N. Relation between Hong Kong virus and former human A2 isolates and the A/EQU12 virus in human sera collected before 1957. *The Lancet* May 3, 907-910 (1969).

Дополнительные ссылки, использующиеся в примере 4.

- AHMADIAN, G., CHAMBERS, P., and EASTON, A. J. (1999). Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses. *J Gen Virol* 80, 2011-6.
- ALANSARI, H., and POTGIETER, L. N. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of the phosphoprotein, nucleocapsid protein, matrix protein and 22K (M2) protein of the ovine respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 75, 3597-601.
- BARR, J., CHAMBERS, P., PRINGLE, C. R., and EASTON, A. J. (1991). Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J Gen Virol* 72, 677-85.
- BAYBUTT, H. N., and PRINGLE, C. R. (1987). Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the RSS-2 strain of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 68, 2789-96.
- BAYON-AUBOYER, M. H., ARNAULD, C., TOQUIN, D., and Eterradosi, N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J Gen Virol* 81, 2723-33.
- BERMINGHAM, A., and COLLINS, P. L. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11259-64.
- BLUMBERG, B.M., Chan, J., AND UDEM, SA (1991). Function of Paramyxovirus 3'and 5'end sequences: In theory and practice. In "the Paramyxoviruses" (D. Kingsbury, Ed.), pp. 235-247. Plenum, New York.
- COLLINS, P. L., and WERTZ, G. W. (1983). cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 3208-12.
- COLLINS, P. L., and WERTZ, G. W. (1985). The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide SEQUENCE of the mRNA and a related polytranscript. *J Virol* 54, 65-71.
- COLLINS, P. L., DICKENS, L.E., BUCKLER-WHITE, A., OLMSTED, R. A., SPRIGGS, M.K., CAMARGO, E., AND COELINGH, K.V.W. (1986). Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc Natl Acad Sci US A* 83, 4594-98.
- COLLINS, P. L., HILL, M. G., and JOHNSON, P. R. (1990). The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen Virol* 71, 3015-20.
- COLLINS, P. L., HILL, M. G., CAMARGO, E., GROSFIELD, H., CHANOCK, R. M., and MURPHY, B. R. (1995). Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11563-7.
- COLLINS, P. L., MCINTOSH, K. AND CHANOCK, R.M. (1996). "Respiratory syncytial virus." In: *Fields virology* (B. N. Knipe, Howley, P.M., Ed.) Lippencott-Raven, Philadelphia.
- COOK, J. K. (2000). Avian rhinotracheitis. *Rev Sci Tech* 19, 602-13.
- CUESTA, I., GENG, X., ASENJO, A., AND VILLANUEVA, N. (2000). Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J. Gen. Virol* 74, 9858-67.

- CURRAN, J. AND KOLAKOFSKY, D. (1999). Replication of paramyxoviruses. *Adv. Virus Res.* 50, 403-422.
- EASTON, A. J., and CHAMBERS, P. (1997). Nucleotide sequence of the genes encoding the matrix and small hydrophobic proteins of pneumonia virus of mice. *Virus Res.* 48, 27-33.
- ELANGO, N., SATAKE, M., and VENKATESAN, S. (1985). mRNA sequence of three respiratory syncytial virus genes encoding two nonstructural proteins and a 22K structural protein. *J Virol.* 55, 101-10.
- FEARNS, R. and COLLINS, P. L. (1999). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol.* 73, 6852-64.
- FELSENSTEIN, J. (1989). "Phyliip-Phylogeny Inference Package (Version 3.2. Cladistics 5)".
- GIRAUD, P., BENNEJEAN, G., GUITTET, M. and TOQUIN, D. (1986). Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet Rec.* 119, 606-7.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- HARDY, R. W. and WERTZ, G. W. (1998). The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol.* 72, 520-6.
- HORVATH, C. M. and LAMB, R. A. (1992). Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J Virol.* 66, 2443-55.
- JENTOFT, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci.* 15, 291-4.
- JOHNSON, P. R., JR., OLMSTED, R. A., PRINCE, G. A., MURPHY, B. K., ALLING, D. W., WALSH, E. E., and COLLINS, P. L. (1987). Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol.* 61, 3163-6.
- JUHASZ, K. and EASTON, A. J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J Gen Virol.* 75, 2873-80.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-142.
- LAMB, R. A. AND KOLAKOFSKY, D. (1996). "Paramyxoviridae: the viruses and their replication". In: *Fields virology* (B. N. Knipe, Howley, P.M., Ed.) Lippencott-Raven, Philadelphia.
- LI, J., LING, R., RANDHAWA, J. S., SHAW, K., DAVIS, P. J., JUHASZ, K., PRINGLE, C. R., EASTON, A. J., and CAVANAGH, D. (1996). Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. *Virus Res.* 41, 185-91.
- LING, R., EASTON, A. J. and PRINGLE, C R. (1992). Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. *J Gen Virol.* 73, 1709-15.
- LING, R., DAVIS, P. J., YU, Q., WOOD, C M., PRINGLE, C. R., CAVANAGH, D., and EASTON, A. J. (1995). Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. *Virus Res.* 36, 247-57.
- MARIOT, A.C., SMITH, J.M., AND EASTON, A. (2001). Fidelity of leader and trailer sequence usage by the respiratory syncytial virus and avian pneumovirus replication complexes. *J. Virol.* 75, 6265-72.
- MINK, M. A., STEC, D. S. and COLLINS, P. L. (1991). Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24.
- MIYAHARA, K., KITADA, S., YOSHIMOTO, M., MATSUMURA, H., KAWANO, M., KOMADA, H., TSURUDOME, M., KUSAGAWA, S., NISMO, M., and ITO, Y. (1992). Molecular evolution of human paramyxoviruses. Nucleotide sequence analyses of the human parainfluenza type 1 virus NP and M protein genes and construction of phylogenetic trees for all the human paramyxoviruses. *Arch Virol.* 124, 255-68.
- MORRISON, T. G. (1988). Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res.* 10, 113-35.
- NAYLOR, C J., BRITTON, P. and CAVANAGH, D. (1998). The ectodomains but not the transmembrane domains of the fusion proteins of subtypes A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 79, 1393-8.
- PLOWS, D. J. and PRINGLE, C. R. (1995). Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A. *Virus Genes* 11, 37-45.
- POCH, O., BLUMBERG, B. M., BOUGUERET, L. and TORDO, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol.* 71, 1153-62.
- POCH, O., SAUVAGET, I., DELARUE, M. and TORDO, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J.* 8, 3867-74.
- RANDHAWA, J. S., MARIOTT, A. C, PRINGLE, C. R., and EASTON, A. J. (1997). Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J Virol.* 71, 9849-64.

RANDHAWA, J. S., WILSON, S. D., TOLLEY, K. P., CAVANAGH, D., PRINGLE, C. R., and EASTON, A. J. (1996). Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. *J Gen Virol* 77, 3047-51.

SAMAL, S. K. and ZAMORA, M. (1991). Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 72, 1716-20.

SATAKE, M. and VENKATESAN, S. (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein. *J Virol* 50, 92-9.

SEAL, B. S., SELLERS, H. S. and MEINERSMANN, R. J. (2000). Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res* 66, 139-47.

SEDLMEIER, R. and NEUBERT, W. J. (1998). The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function. *Adv Virus Res* 50, 101-39.

STEC, D.S., HELL, M.G., 3RD, AND COLLINS, P.L. (1991). Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* 183, 273-87.

VAN DEN HOOGEN, B. G., DE JONG, J. C., GROEN, J., KUIKEN, T., DE GROOT, R., FOUCHEIER, R. A., and OSTERHAUS, A. D. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7(6), 719-24.

VIRUS TAXONOMY (2000). Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses.

WERTZ, G. W., COLLINS, P. L., HUANG, Y., GRUBER, C., LEVINE, S., and BALL, L. A. (1985). Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4075-9.

YU, Q., DAVIS, P. J., BARRETT, T., BINNS, M. M., BOURSSELL, M. E., and CAVANAGH, D. (1991). Deduced amino acid sequence of the fusion glycoprotein of turkey rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses. *J Gen Virol* 72, 75-81.

YU, Q., DAVIS, P. J., LI, J. and CAVANAGH, D. (1992). Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology* 186, 426-34.

ZAMORA, M., and SAMAL, S. K. (1992). Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 73, 737-41.

Праймеры, применяемые для детекции известных парамиксовирусов посредством RT-PCR. Праймеры для hPIV 1-4, свинки, кори, Тираиа, Маруера и Hendra разработаны самостоятельно и основывались на выравнивании известных последовательностей. Праймеры для вируса болезни Ньюкасла получены от Seal, J.J. et al; *Clin. Microb.*, 2624-2630, 1995. Праймеры для Nipah и для ПЦР общего вида парамиксовирусов получены от Chua, K.B., et al; *Science*, 288 26 may 2000.

Вирус	праймер	расположен в белке
HPIV-1	Прям. 5'-TGTGTCGAGACTATTCCAA-3' Обратн. 5'-TGTG(T/A)ACCAGTGCAGTCT-3'	HN
HPIV-2	Прям. 5'-TGCTGCTCTATTGAGAAACGCC-3' N Обратн. 5'-GGTGAC/T TC(T/C)AATAGGGCCA-3'	
HPIV-3	Прям. 5'-CTCGAGGTTGTCAGGATATAG-3' Обратн. 5'-CTTGAGGTTGAACACAGTT-3'	HN
HPIV-4	Прям. 5'-TTC(A/G)GTTTTAGCTGCTTACG-3' N Обратн. 5'-AGGCAAATCTCTGGATAATGC-3'	
Свинка	Прям. 5'-TCGTAACGTCTCGTGACC-3' Обратн. 5'-GGAGATCTTCTAGAGTGAG-3'	SH
NDV	Прям. 5'-CCTTGGTGAiTCTATCCGAG-3' Обратн. 5'-CTGCCACTGCTAGTTGAGATAATCC-3'	F
Tupaia	Прям. 5'-GGGCTTCTAAGCGACCCAGATCTTG-3' Обратн. 5'-GAATTCCCTATGGACAAGCTCTGTGC-3'	N
Mapuera	Прям. 5'-GGAGCAGGAACCTCAAGACCTGGAG-3' Обратн. 5'-GCTCAACCTCATCACATACTAACCC-3'	N
Hendra	Прям. 5'-GAGATGGCGGGCAAGTGCGGGCAACAG-3' N Обратн. 5'-GCCTTGCAATCAGGATCCAATTGGG-3'	
Nipah	Прям. 5'-CTGCTGCAGTTCAGGAAACATCAG-3' Обратн. 5'-ACCGGATGTGCTCACAGAACTG-3'	N
HRSV	Прям. 5'-TTGTTATAGGCATATCATTG-3' Обратн. 5'-TTAACCAAGCAAAGTGTAA-3'	F
Корь	Прям. 5'-TTAGGGCAAGAGATGGTAAGG-3' Обратн. 5'-TTATAACAATGATGGAGGG-3'	N

*Paramyxoviridae* вообще:

Прям. 5'-CATTAAAAAGGGCACAGACGC-3' P  
Обратн. 5'-TGGACATTCTCCGCAGT-3'

Праймеры для RAP-PCR:

ZF1: 5'-CCCAACCACCAAGAGAGAAA-3'  
ZF4: 5'-ACCAACCAGAGAGAAACCC-3'  
ZF7: 5'-ACCAGAGAGAAACCCACC-3'  
ZF10: 5'-AGAGAGAAACCCACCACC-3'  
ZF13: 5'-GAGAAACCCACCACCAAGA-3'  
ZF16: 5'-AAACCCACCAACCAGAGAG-3'

CS1: 5'-GGAGGCAAGCGAACGCAA-3'  
CS4: 5'-GGCAAGCGAACGCAAGGA-3'  
CS7: 5'-AAGCGAACGCAAGGAGGC-3'  
CS10: 5'-CGAACGCAAGGAGGCAG-3'  
CS13: 5'-ACGCAAGGAGGCAGCGA-3'  
CS16: 5'-CAAGGAGGCAAGCGAACG-3'

Определены последовательности у успешно очищенных 20 фрагментов:

10 фрагментов, для которых обнаружена гомология в последовательности APV

Фрагмент 1 ZF 7, 335 п.н. ген N

Фрагмент 2 ZF 10, 235 п.н. ген N

Фрагмент 3 ZF 10, 800 п.н. ген M

Фрагмент 4 CS 1, 1250 п.н. ген F

Фрагмент 5 CS 10, 400 п.н. ген F

Фрагмент 6 CS 13, 1450 п.н. ген F

Фрагмент 7 CS 13, 750 п.н. ген F

Фрагмент 8 ZF 4, 780 п.н. ген L (на уровне белка)

Фрагмент 9 ZF 10, 330 п.н. ген L (на уровне белка)

Фрагмент 10 ZF 10, 250 п.н. ген L (на уровне белка)

Праймеры применяли для амплификации RAP-PCR нуклеиновых кислот из изолята-прототипа.

Пример 5. Дополнительное изучение двух подтипов hMPV.

Основываясь на филогенетическом анализе различных изолятов hMPV, полученных до настоящего времени, идентифицировали два генотипа с вирусным изолятом 00-1 в качестве прототипа генотипа A и изолятом 99-1 в качестве прототипа генотипа B.

Авторы настоящего изобретения предположили, что генотипы связаны с подтипами и что повторное инфицирование вирусами обеих подгрупп происходит в присутствии существующего иммунитета, а изменения антигенов не являются строго необходимыми для возникновения повторного инфицирования. Более того, hMPV оказывается близкородственным с пневмовирусом птиц, вирусом, первично обнаруженным у домашней птицы. Нуклеотидные последовательности обоих вирусов проявляют высокий процент гомологии, за исключением белков SH и G. Здесь авторы настоящего изобретения показывают, что вирусы перекрестно реагируют в тестах, основанных главным образом на нуклеопротеине и матриксном белке, но по-разному отвечают в тестах, основанных на белках прикрепления. Отличия в титрах нейтрализации вируса представляют дополнительное доказательство того, что два генотипа hMPV являются двумя различными серотипами одного вируса, где APV является отличным вирусом.

Перекрестная реакция двух серотипов и перекрестная реакция APV и hMPV

### Способы

Протокол для выявления hMPV с помощью антител IgG, IgA и IgM:

Непрямой EIA IgG для hMPV проводили в планшетах для микротитрования по существу так, как описано ранее (Rothbarth, P. H. et al., 1999; Influenza virus serology-a comparative study. J. of Vir. Methods 78 (1999) 163-169).

Вкратце, концентрированный hMPV растворяли посредством обработки 1% Triton X-100 и, после определения оптимального рабочего разведения посредством титрования по типу шахматной доски, оставляли закрытыми в PBS в планшетах для микротитрования 16 ч при комнатной температуре. Потом, образцы сыворотки человека разведенной в соотношении 1:100 в буфере для EIA в объеме 100 мкл добавляли в лунки и инкубировали 1 ч при 37°C. Связывание IgG человека выявляли посредством добавления IgG козы против антител человека, конъюгированных с пероксидазой (Biosource, USA). Добавлением TMB как субстрата планшеты проявляли и измеряли ОП при 450 нм. Результаты выражали как соотношение сигнал/отсутствие сигнала (S/N) ОП. Сыворотку считали позитивной на IgG, если отношение S/N находилось выше отрицательного контроля плюс три стандартных отклонения.

Антитела против hMPV классов IgM и IgA в сыворотке выявляют посредством захвата EIA по существу так, как описано ранее (Rothbarth, P. H. et al., 1999; Influenza virus serology-a comparative study. J. Vir. methods 78 (1999) 163-169). Для выявления IgA и IgM использовали коммерчески доступные планшеты для микротитрования, покрытые моноклональными антителами IgM или IgA, специфичными против антител человека. Сыворотки разводили в соотношении 1:100 и после инкубации в течение 1 ч при 37°C к каждой лунке добавляли hMPV в оптимальном рабочем разведении (100 мкл). Инкубировали 1 ч при 37°C. После отмычки добавляли меченные пероксидазой поликлональные антитела против hMPV, планшеты инкубировали 1 ч при 37°C. Добавлением TMB как субстрата планшеты проявляли и измеряли ОП при 450 нм. Результаты выражали как отношение сигнал/шум (S/N) ОП. Сыворотку считали позитивной на IgG, если соотношение S/N находилось выше отрицательного контроля плюс три стандартных отклонения.

Антитела к APV выявляли посредством анализа ингибирования APV. Протокол для теста ингибирования APV включает ферментный иммунологический анализ APV-Ab SVANOVIR®, разработанный SVANOVA Biotech AB, Uppsala Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala Sweden. Результаты выражали как отношение сигнал/шум (S/N) ОП. Сыворотку считали позитивной на IgG, если соотношение S/N находилось выше отрицательного контроля плюс три стандартных отклонения.

1. Морские свинки.

А. (Повторное) инфицирование морских свинок обоими подтипами hMPV.

Вирусные изоляты ned/00/01 (подтип A) и ned/99/01 (подтип B) применяли для инокуляции каждого изолята 6 морским свинкам (интраптракеально, в нос и глаза).

6 морских свинок, инфицированных hMPV 00-1 ( $10e6,5$  TCID50);  
 6 морских свинок, инфицированных hMPV 99-1 ( $10e4,1$  TCID50).

Через 54 сутки после первичного инфицирования морским свинкам инокулировали гомологичные и гетерологичные подтипы ( $10e4$  TCID50/мл):

2 морских свинки: 1 инфицирование - 00-1; 2 - 99-1 (гетерологичный);  
 3 морских свинки: 1 инфицирование - 00-1; 2 - 00-1 (гомологичный);  
 2 морских свинки: 1 инфицирование - 99-1; 2 - 00-1 (гетерологичный);  
 3 морских свинки: 1 инфицирование - 99-1; 2 - 99-1 (гомологичный).

Смывы из горлани и носа собирали через 12 суток (1 инфицирование) и 8 суток (2 инфицирование) после инфекции и тестировали на предмет присутствия вируса посредством анализов RT-PCR.

Результаты анализа RT-PCR: фиг. 29.

Краткое изложение результатов: у морских свинок, инокулированных вирусным изолятом ned/00/01, инфицирование верхних дыхательных путей выявляют с 1 по 10 сутки после инфицирования. У морских свинок, инокулированных вирусным изолятом ned/99/01, инфицирование верхних дыхательных путей выявляют с 1 по 5 сутки после инфицирования. Инфекция ned/99/01 выглядит менее тяжелой, чем инфекция ned/00/01. Вторая инокуляция морских свинок гетерологичным вирусом приводит к повторному инфицированию у 3 из 4 морских свинок, а гомологичным вирусом - 2 из 6. У животных, заразившихся повторно, не замечено клинических симптомов или они являлись слабыми, а у животных, защищенных от повторного инфицирования, не наблюдали клинических симптомов, демонстрируя, что даже для вируса дикого типа защитный эффект первого инфицирования очевиден, указывая на возможное применение гетерологичных (и конечно гомологичных) изолятов в качестве вакцины, даже в неактивированной форме.

Оба подтипа hMPV способны заражать морских свинок, хотя инфицирование подтипов B (ned/99/01) кажется менее тяжелым (более короткий период присутствия вируса в носоглотке), чем инфицирование подтипов A (ned/00/01). Это может являться следствием более высокой дозы подтипа A или меньшей вирулентности подтипа B.

Хотя наличие предсуществующей иммунности не полностью защищает от повторного инфицирования и гомологичным и гетерологичным вирусом, инфицирование кажется менее заметным, так как отмечен более короткий период присутствия вируса и не все животные становились вирус-позитивными.

В. Серология морских свинок, инфицированных обоими подтипами hMPV.

Сыворотки морских свинок собирали на 0, 52, 70, 80, 90, 110, 126 и 160 сутки и проверяли посредством ELISA полноразмерного вируса в отношении антигенов ned/00/01 и ned/99/01 в разведении 1:100.

Фиг. 30 А и В: ответ IgG против ned/00/01 и ned/99/01 у каждой морской свинки.

Фиг. 31: специфичность ELISA ned/00/01 и ned/99/01. Использовали данные только гомологично повторно инфицированных морских свинок.

Фиг. 32: средний ответ IgG против ELISA ned/00/01 и ned/99/01 у 3 гомологично (00-1/00-1), 2 гомологично (99-1/99-1), 2 гетерологично (99-1/00-1) и 2 гетерологично (00-1/99-1) инфицированных морских свинок.

Краткое изложение результатов:

Наблюдали только минимальные различия в ответ на два различных ELISA. ELISA полноразмерного вируса в отношении 00-1 и 99-1 нельзя использовать для различия двух подтипов.

С. Реактивность сывороток, активированных против hMPV у морских свинок с антигеном APV.

Сыворотки собирали у инфицированных морских свинок, проверенных с помощью ингибиции APV ELISA.

Фиг. 33: средний процент ингибиции APV у инфицированных hMPV морских свинок.

Краткое изложение результатов:

Сыворотки морских свинок, активированные против hMPV, реагировали в тесте ингибиции APV таким же образом, как они реагировали в анализах ELISA IgG против hMPV.

Сыворотки, активированные против ned/99/01, показали более низкий процент ингибиции APV в ELISA, чем сыворотки, активированные против ned/00/01. Морские свинки, инфицированные ned/99/01, могут обладать меньшим титром (как видно в анализах ELISA hMPV) или перекрестная реакция, ned/99/01 с APV меньше, чем у ned/00/01. Тем не менее, для обнаружения у морских свинок антител против hMPV можно применять ELISA ингибиции APV-Ab.

Д. Анализы нейтрализации вируса сывороткой, активированной против hMPV у морских свинок.

Сыворотки, собранные на 0, 52, 70 и 80 сутки после инфицирования, применяли в анализе (перекрестной) нейтрализации вируса с ned/00/01, ned/99/01 и APV-C. Начальное разведение составляло 1 к 10, а на лунку применяли 100 TCID50 вируса. После нейтрализации вирус переносили на клетки tMK, 15 мин центрифугировали при 3500 об/мин, после чего среду обновляли.

Пробы APV выращивали 4 суток, а пробы hMPV-7. Клетки фиксировали 80% ацетоном и проводили IFA с мечеными FITC антителами обезьяны против hMPV. Негативно окрашенные лунки рассматривали как нейтрализующий титр. Для каждого вируса включали 10-log титрование маточного раствора вируса и 2-кратное титрование рабочего раствора.

Фиг. 34: титры нейтрализации вируса инфицированных ned/00/01 и ned/99/01 морских свинок антителами против ned/00/01, ned/99/01 и APV-C.

## 2. Макаки-крабоеды.

А. (Повторная) инфекция макаков-крабоедов двумя подтипами hMPV.

Вирусные изоляты ned/00/01 (подтип А) и ned/99/01 (подтип В) ( $10^5$  TCID50) применяли для инокуляции по 2 макакам-крабоедам на подтип (интраптракеально, в нос и глаза). Через шесть месяцев после первичного инфицирования макакам второй раз инокулировали ned/00/01. Глоточные мазки собирали в течение 14 (1 инфицирование) или 8 суток (2 инфицирование) после инфицирования, и тестировали на предмет наличия вируса посредством анализов RT-PCR.

Фиг. 35: результаты анализов RT-PCR на материале глоточных мазков макаков-крабоедов (дважды) инокулированных ned/00/01.

Краткое изложение результатов:

У макаков-крабоедов, инокулированных вирусным изолятом ned/00/01, инфицирование верхних дыхательных путей выявляли с 1 по 10 сутки после инфицирования. Клинические симптомы включали гнойный ринит. Вторая инокуляция гомологичного вируса макакам привела к повторному инфицированию, что продемонстрировано посредством PCR, однако, клинические симптомы не выявили.

В. Серология сывороток собранных у инфицированных hMPV макаков-крабоедов.

У макаков, получавших ned/00/01, собирали сыворотки в течение 6 месяцев после первичного инфицирования (повторное инфицирование проводили на 240 сутки у обезьяны 3 и 239 сутки у обезьяны 6).

Сыворотки применяли для тестирования на предмет наличия антител IgG или против ned/00/01 или против APV и на предмет наличия антител против антигенов IgA и IgM против ned/00/01.

Результаты: фиг. 36А.

Ответ IgA, IgM и IgG против ned/00/01 у 2 макаков-крабоедов, (повторно) инфицированных ned/00/01.

Фиг. 36В - ответ IgG против APV у 2 макаков-крабоедов, инфицированных ned/00/01.

Краткое изложение результатов:

Двух макаков успешно заразили ned/00/01 и в присутствии антител против ned/00/01 заразили повторно гомологичным вирусом. Ответ к антителам IgA и IgM показал увеличение антител IgM после первого инфицирования и их отсутствие после повторного инфицирования. Антитела IgA обнаруживали только после повторного инфицирования, демонстрируя немедленный иммунный ответ после первой инфекции. Сыворотка у макаков, активированная против hMPV, которую тестировали посредством ELISA ингибирования APV, показал сходный с ELISA IgG к hMPV ответ.

## Обсуждение/вывод

Посредством ELISA ингибирования APV антитела против hMPV у макаков-крабоедов обнаружили с той же чувствительностью, что и посредством ELISA IgG к hMPV и, поэтому, ELISA ингибирования APV подходит для тестирования образцов у человека на предмет присутствия антител к hMPV.

С. Анализы (перекрестной) нейтрализации вирусов сыворотками, собранными у инфицированных hMPV макаков-крабоедов.

Краткое изложение результатов: у сывороток, собранных от 0 до 229 суток после первичного инфицирования, выявили только низкие титры нейтрализации в отношении ned/00/01 (0-80), у сывороток, собранных после вторичного инфицирования, выявили высокие титры нейтрализации в отношении ned/00/01: >1280. Только у сывороток, собранных после вторичного инфицирования, выявили титры нейтрализации в отношении ned/99/01 (80-640) и ни одна из сывороток не нейтрализовала вирус APV-C.

При анализах (перекрестной) нейтрализации вирусов перекрестной реакции APV-C и hMPV не выявлено, тогда как перекрестные реакции ned/00/01 и ned/99/01 выявлены после повышения ответа в виде антител.

## 3. Люди.

Сыворотки пациентов в диапазоне возрастов от <6 месяцев до >20 лет ранее тестировали посредством IFA и анализов нейтрализации вируса в отношении ned/00/01 (см. табл. 1 патента).

Здесь авторы настоящего изобретения тестировали ряд данных сывороток на предмет присутствия антител IgG, IgM и IgA посредством ELISA против ned/00/01, а также авторы настоящего изобретения тестировали образцы посредством ELISA ингибирования APV.

Результаты: фиг. 37. Сравнение применения ELISA hMPV и ELISA ингибирования APV для обнаружения антител IgG в сыворотках человека, существует сильная корреляция между тестом на IgG к hMPV и тестом APV-Ab, поэтому тест APV-Ab, по существу, способен обнаружить у людей антитела IgG к hMPV.

## 4. Домашняя птица.

96 цыплят тестировали и посредством ELISA ингибирования APV, и посредством ELISA ned/00/01 на предмет присутствия антител IgG против APV.

Краткое изложение результатов: ELISA hMPV, и ELISA ингибирования APV обнаружили антитела против APV (данные не показаны)

Краткое изложение результатов.

Авторы настоящего изобретения обнаружили два генотипа MPV с ned/00/01, являющимся прототипом кластера А, и ned/99/01, являющимся прототипом кластера В.

«Согласно классическим серологическим анализам (как, например, известно из Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., and Brown, F., Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1991. Supplement 2: p. 140-144), два подтипа можно определить на основе их иммунологических различий, что определяли посредством количественных анализов нейтрализации с антисывороткой животных. Два различных серотипа не обладают перекрестной активностью один по отношению к другому или демонстрируют соотношение титра гомологичного к гетерологичному  $>16$  в обоих направлениях. Если нейтрализация выявляет некоторую степень перекрестной реакции двух вирусов в одном из двух или в обоих направлениях (соотношение титра гомологичного к гетерологичному восемь или 16), отличия серотипов принимают при наличии существенных биофизических/биохимических отличий ДНК. Если нейтрализация выявляет отчетливую перекрестную реакцию двух вирусов в одном из двух или в обоих направлениях (соотношение титра гомологичного к гетерологичному меньше, чем восемь), полагают, что изучаемые серотипы изолятов идентичны».

Для RSV известно, что повторное инфицирование происходит при наличии предсуществующей иммунности (и гомологичной и гетерологичной). Инфицирование морских свинок или макаков-крабоедов и гомологичным и гетерологичным серотипами hMPV выявило, что это так же верно и для hMPV. Кроме того, анализы ELISA IgA и IgM к hMPV выявили, что реакция антител IgA происходит только после повторной инфекции. Сыворотка, индуцированная против hMPV или APV, отвечает одинаковым способом в анализах ELISA APV и hMPV. Из сравнения нуклеотидной последовательности известно, что вирусы проявляют гомологию аминокислот в размере примерно 80% генов N, P, M и F. В анализах ELISA белки N и M являются основными антигенами для реакции. Анализы нейтрализации вируса (известные тем, что реагируют против поверхностных гликопротеинов G, SH и F) показывают разницу между двумя различными сыворотками. Хотя APV и hMPV перекрестно реагируют в ELISA, с другой стороны, филогенетические анализы нуклеотидных последовательностей hMPV и APV, различия в титрах нейтрализации вируса сывороток, активированных против двух различных сывороток, и различия в используемом хозяине выявляют, что APV-C и hMPV являются двумя различными вирусами. Основываясь на результатах, авторы настоящего изобретения предполагают, что инфицирование hMPV млекопитающих, возможно, является результатом зоонозного переноса от птиц млекопитающим. Но вирус в этом случае адаптировался так (например, белки G и SH), что обратный (от млекопитающих птицам) зоонозный перенос представляется маловероятным, учитывая наличие у птиц APV.

### Приложение

#### Исходная информация о Pneumovirinae

Семейство Paramyxoviridae содержит два подсемейства: Paramyxovirinae и Pneumovirinae. Подсемейство Pneumovirinae состоит из двух родов: Pneumovirus и Metapneumovirus. Род Pneumovirus содержит респираторно-синцитиальные вирусы человека, коровы, овцы и козы и вирус пневмонии мышей (PVM). Род Metapneumovirus содержит пневмовирусы птиц (APV, также упоминаемые как TRTV).

Классификация родов в подсемействе Pneumovirinae основывается на классических вирусных характеристиках, порядке генов и группировке генов. Вирусы рода Pneumovirus являются уникальными в семействе Paramyxoviridae, обладая двумя неструктурными белками на 3'-конце генома (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'). В отличие от этого, у вирусов рода Metapneumovirus отсутствуют гены NS1 и NS2, и организация генов между кодирующими областями M и L отличается: 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'.

Все представители подсемейства Paramyxovirinae обладают гемагглютинирующей активностью, но данная функция не является определяющей особенностью подсемейства Pneumovirinae, отсутствуя у RSV и APV, но присутствуя у PVM. Активность нейраминидазы присутствует у представителей родов Paramyxovirus and Rubulavirus (подсемейство Paramyxovirinae), но отсутствует у рода Morbillivirus (подсемейство Paramyxovirinae) и у родов Pneumovirus and Metapneumovirus (подсемейство Pneumovirinae).

Второй характерной особенностью подсемейства Pneumovirinae является кажущееся ограниченное использование альтернативных ORF в мРНК у RSV. В противоположность этому, отдельным представителям подсемейства Paramyxovirinae, таким как вирусы Сендай и кори, для направления синтеза новых белков доступны альтернативные ORF в мРНК, кодирующей фосфопротеин (P).

Белок G Pneumovirinae не обладает родственной последовательностью или схожей структурой с белками HN и N Paramyxovirinae и обладает примерно только половиной длины их цепи. Кроме того, белки N и P меньше, чем их копии у Paramyxovirinae и не обладают несомненной гомологией последовательности. Большинство несегментированных РНК-содержащих вирусов с "минус"-цепью обладают одним матрикским белком (M). Представители подсемейства Pneumovirinae являются исключением, обладая двумя такими белками - M и M2. Белок M меньше, чем его копия у Paramyxovirinae и не обладает родственной с Paramyxovirinae последовательностью.

При росте на клеточной культуре представители подсемейства Paramyxovirinae демонстрируют типичный цитопатический эффект: они индуцируют характерное образование синцитиев клеток. (Collins, 1996).

### Подсемейство Pneumovirinae, род Pneumovirus

hRSV является типичным видом рода *Pneumovirus* и главной и широко распространенной причиной заболеваний нижних дыхательных путей в течение младенчества и раннего детства (Selwyn, 1990). Кроме того, hRSV все больше признают важным патогенным микроорганизмом в других группах пациентов, включающих субъектов с иммунным дефицитом и пожилых. RSV также является важной причиной домашней пневмонии у госпитализированных взрослых всех возрастов (Englund, 1991; Falsey, 2000; Dowell, 1996). Основываясь на разнице взаимодействия с моноклональными и поликлональными антителами и при посредстве анализов последовательностей нуклеиновых кислот (Anderson, 1985; Johnson, 1987; Sullender, 2000) идентифицировали два главных антигенных типа RSV (A и B). В частности, для различия двух подтипов, использовали белок G. RSV-A и -B обладают только 53% гомологии аминокислот в G, тогда как остальные белки у подтипов демонстрируют более высокую гомологию (табл. 1) (Collins, 1996).

Описано выявление инфекции RSV посредством моноклональных и поликлональных антител в иммунофлуоресцентных способах (DIF, IFA), анализах нейтрализации вируса и ELISA или анализах RT-PCR (Rothbarth, 1988; Van Milaan, 1994; Coggins, 1998). Близким родственником hRSV является коровий (bRSV), овечий (oRSV) или козий (cRSV) RSV, из которых наиболее широко изучен bRSV. Основываясь на гомологии последовательности с hRSV, вирусы RSV жвачных классифицировали как принадлежащие к роду *Pneumovirus* подсемейства Pneumovirinae (Collins, 1996). Диагностика инфекции RSV жвачных и отнесение к подтипам основывается на комбинированном применении серологии, детекции антигена, изоляции вируса и анализах RT-PCR (Utterthal, 1996; Valarcher, 1999; Oberst, 1993; Vilcek, 1994).

Используя антисыворотки человека и коровы, моноклональные антитела и кДНК-зонды провели несколько анализов молекулярной организации bRSV. Данные анализы выявили, что составы белков hRSV и bRSV являются очень сходными, а геномная организация bRSV сходна с геномной организацией hRSV. Для обоих bRSV и hRSV белки G и F представляют собой главные антигены для нейтрализации и защитные антигены. Белок G высоко вариабелен у подтипов hRSV и у hRSV и bRSV (53% и 28% соответственно) (Prozzi, 1997; Lerch, 1990). Белки F штаммов hRSV и bRSV обладают сравнимыми структурными характеристиками и антигенным сродством. Белки F bRSV проявляют гомологию с hRSV в размере 80-81%, тогда как два подтипа hRSV обладают гомологией по F в размере 90% (Walravens, K., 1990).

Исследования, основанные на применении моноклональных антител к hRSV и bRSV, наводят на мысль о том, что существуют другие антигенные подтипы bRSV. Подтипы A, B и AB различили на основе картины взаимодействий моноклональных антител, специфичных к белкам G (Furze, 1994; Prozzi, 1997; Elvander, 1998). Эпидемиология bRSV очень сходна с эпидемиологией hRSV. Спонтанное инфицирование молодняка рогатого скота часто ассоциировано с тяжелыми респираторными признаками, тогда как экспериментальное инфицирование обычно приводит к более умеренному заболеванию с незначительными патологическими изменениями (Elvander, 1996).

RSV также выделили у инфицированных в естественных условиях овец (oRSV) (LeaMaster, 1983) и коз (cRSV) (Lehmkuhl, 1980). Оба штамма обладают гомологией нуклеотидной последовательности с коровьим RSV в размере 96% и перекрестно реагируют в отношении антигенов. Следовательно, данные вирусы также классифицируют как принадлежащие к роду *Pneumovirus*.

Особым представителем подсемейства Pneumovirinae, рода *Pneumovirus* является вирус пневмонии мышей (PVM).

PVM является обычным патогенным организмом в колониях лабораторных животных, конкретно колоний бестимусных мышей. Думают, что инфекция, приобретенная естественным путем, протекает бессимптомно, однако пассаж вируса в легкие мышей приводит к очевидным признакам заболевания в диапазоне от инфекции верхних дыхательных путей до пневмонии со смертельным исходом (Richter, 1988; Weir, 1988).

Описывают ограниченную серологическую перекрестную реактивность нуклеокапсидного белка (N) и фосфопротеина (P) у PVM и hRSV, но другие поверхностные белки не проявляют перекрестной реактивности, и вирусы можно различить друг от друга в анализах нейтрализации вируса (Chambers, 1990a; Gimenez, 1984; Ling, 1989a).

Оказывается, что гликопротеины PVM отличаются от гликопротеинов других парамиксовирусов и имеют сходство с гликопротеинами RSV на основе картины их гликозилирования. Однако они отличаются на основе процессинга. В отличие от RSV, но сходно с другими парамиксовирусами, PVM обладает гемагглютинирующими активностью в отношении эритроцитов мышей, за что, оказывается, отвечает белок G, так как моноклональное антитело к этому белку ингибитирует гемагглютинацию (Ling, 1989b).

Геном PVM обладает сходством с геномом hRSV, включая неструктурные белки на 3'конце, и схожей организацией генома (Chambers, 1990a; Chambers, 1990b). Нуклеотидные последовательности генов NS1/NS2 у PVM не обнаруживают гомологии с последовательностями данных генов у hRSV (Chambers, 1991). Некоторые белки у PVM проявляют сильную гомологию с hRSV (N: 60% и F: от 38 до 40%), в то время как G отчетливо отличается (аминокислотная последовательность длиннее на 31%) (Barr, 1991; Barr, 1994; Chambers, 1992). Описано, что ген P у PVM, но не у RSV или APV, кодирует вторичную ORF,

представляющую уникальный белок у PVM (Collins, 1996). Новые изоляты PVM идентифицированы посредством выделения вируса, анализов гемагглютинации, анализа нейтрализации вируса и различными способами с применением иммунофлуоресценции.

Таблица с приложением

Гомология аминокислот у различных вирусов рода *Pneumovirus* подсемейства *Pneumovirinae*

Ген	Вирусы hRSV	Вирусы bRSV	oRSV c hRSV	bRSV c hRSV	bRSV c oRSV	PVM c hRSV
NS1	87			68-69	89	*
NS2	92			83-84	87	*
N	96		93			60
P	-		81			
M	-		89			
F	89			80-81		38-40
G	53	88-100	21-29	38-41	60-62	*
M2	92		94			41
SH	76		45-50		56	
L	-					

\* Не обнаруживают гомологию последовательности

#### Род *Metapneumovirus*

Птичьи пневмовирусы (APV) идентифицировали как этиологический агент ринотрахеита индеек (McDougall, 1986; Collins, 1988), и, следовательно, его часто называют вирусом ринотрахеита индеек (RTTV). Заболевание представляет собой инфекцию верхних дыхательных путей индеек, приводящую к высокой заболеваемости и иногда, но не очень часто, к высокой смертности. У индеек вирус может индуцировать существенное снижение продукции яиц. Тот же вирус может также заражать цыплят, но для данного вида роль данного вируса как первичного патогенного микроорганизма выяснили недостаточно, хотя он обычно ассоциирован с синдромом опухания головы (SHS) у птицеводов (Cook, 2000).

Вирионы плейоморфны, хотя в основном сферические, с размерами в диапазоне от 70 до 600 нм, а нуклеокапсид, содержащий линейный, несегментированный, антисмысловой геном на основе РНК, обнаруживает спиральную симметрию (Collins, 1986; Giraud, 1986). Данная морфология сходна с морфологией представителей семейства Paramyxoviridae. Анализы кодируемых APV белков и РНК наводят на мысль о том, что из двух подсемейств данного семейства (Paramyxovirinae и Pneumovirinae), APV больше всего похож на Pneumovirinae (Collins, 1988; Ling, 1988; Cavanagh, 1988).

APV не обладает неструктурными белками (NS1 и NS2), а порядок генов (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') отличается от пневмовирусов млекопитающих, таких как RSV. Поэтому APV, в последнее время, классифицируют как типовой вид нового рода *Metapneumovirus* (Pringle, 1999).

Различия в картинах нейтрализации, ELISA и реактивности моноклональных антител выявили существование различных антигенных типов APV. Определение последовательности нуклеотидов гена G привело к определению двух подтипов вируса (A и B), обладающих только 38% гомологии аминокислот (Collins, 1993; Juhasz, 1994). Показано, что APV, выделенный в Колорадо, США (Cook, 1999), плохо взаимодействует в реакции перекрестной нейтрализации с вирусами подтипов A и B и, основываясь на информации о последовательности, его обозначили как новый подтип C (Seal, 1998; Seal 2000). Два не-А/не-В APV выделили во Франции и показали отличие их антигенов от подтипов A, B и C. Основываясь на аминокислотных последовательностях генов F, L и G, данные вирусы снова классифицировали как новый подтип D (Bayon-Auboyer, 2000).

Диагностику инфекции APV можно выполнять посредством выделения вируса в культурах органов цыплят или индеек (TOCs) или в культурах клеток Vero. Цитопатический эффект (CPE) обычно наблюдают после одного или двух дополнительных пассажей. Данный CPE характеризуется рассеянными очагами клеточных скоплений, приводящих к образованию синцитиев (Buys, 1989). Разработан ряд серологических анализов, включая IF и анализы нейтрализации вируса. Обнаружение антител к APV посредством ELISA является наиболее часто применяемым способом (O'Loan, 1989; Gulati, 2000). В последнее время для диагностики инфекций APV используют полимеразную цепную реакцию (PCR). Мазки, взятые из пищевода, можно использовать как исходный материал (Bayon-Auboyer, 1999; Shin, 2000).

- Alansari, H. and Potgieter, L.N.D. 1994. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus non-structural 1C and 1B genes and the small hydrophobic protein gene. *J.Gen.ViroL*. 75: 401-404.
- Alansari, H., Duncan R.B., Baker, J.C. and Potgieter, L.N. 1999. Analysis of ruminant respiratory syncytial virus isolates by RNase protection of the G glycoprotein transcripts. *J.Vet.Diagn.Invest.* 11: 215-20.
- Anderson, L.J., Hierholzer, J.C., Tsou, C., Hendry, R.M., Fornic, B.F., Stone, V. and McIntosh, K. 1985. Antigenic characterisation of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Inf. Dis.* 151: 626-633.
- Barr, J., Chambers, Pringle, C.R., Easton, A. J. 1991. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J.Gen.ViroL*. 72: 677-685.
- Barr, J., Chambers, P., Harriott, P., Pringle, C.R. and Easton, A.J. 1994. Sequence of the phosphoprotein gene of pneumonia virus of mice: expression of multiple proteins from two overlapping reading frames. *J. Virol.* 68: 5330-5334.
- Bayon-Auboyer, M.H., Jestin, V., Toquin, D., Cherbonnel, M. and Eterradosi, N. 1999. Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch.Vir.* 144:1091-1109.
- Bayon-Auboyer, M.H., Arnauld, C., Toquin, D., and Eterradosi, N. 2000. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J.Gen.ViroL*. 81: 2723-2733.
- Buys, S.B., Du Preez, J.H. and Els, H. J. 1989. The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoort J.Vet.Res.* 66: 87-98.
- Cavanagh, D. and Barrett, T. 1988. Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus. *Virus Res.* 11: 241-256.
- Chambers, P., Pringle, C.R. and Easton, A. J. 1990a. Molecular cloning of pneumonia virus of mice. *J. Virol.* 64: 1869-1872.
- Chambers, P., Matthews, D.A., Pringle, C.R. and Easton, A. J. 1990b. The nucleotide sequences of intergenic regions between nine genes of pneumonia virus of mice establish the physical order of these genes in the viral genome. *Virus Res.* 18: 263-270.
- Chambers, P., Pringle, C.R., and Easton, A. J. 1991. Genes 1 and 2 of pneumonia virus of mice encode proteins which have little homology with the 1C and 1B proteins of human respiratory syncytial virus. *J.Gen.Vir.* 72: 2545-2549.
- Chambers, P., Pringle C.R., Easton A. J. 1992. Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 73:1717-1724.
- Coggins, W.B., Lefkowitz, E.J. and Sullender, W.M. 1998. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3552-3557.
- Collins, M.S. and Gough, R.E., Lister, S. A., Chettle, N. and Eddy, R. 1986. Further characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *Vet. Rec.* 119: 606.
- Collins, M.S. and Gough, R.E. 1988. Characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *J. Gen.ViroL* 69: 909-916.
- Collins, M.S., Gough, R.E., and Alexander, D.J. 1993. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathology* 22: 469-479.
- Collins, P.L., McIntosh, K., Chanock, R.M. 1996. Respiratory syncytial virus. P. 1313-1361. In: B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley (ed.). *Fields virology*, 3rd ed., vol. 1 Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, USA.
- Cook, J.K.A., Huggins, M.B., Orbell, S.J. and Senne, DA. 1999. Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. *Avian pathol.* 28: 607-617.
- Cook, J.K.A. 2000. Avian rhinotracheitis. *Rev. Scitech. off int. Epiz.* 19 : 602-613.
- Dowell, S.F., Anderson, L.J., Gary, H.E., Erdman, D.D., Plouffe, J.F., File, T.M., Marston, B.J. and Breiman, R.F. 1996. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J. Infect .Dis.*174: 456-462.
- Elvander, M. 1996. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Rec.* 138: 101-105.
- Elvander, M., Vilcek, S., Baule, C., Utenthal, A., Ballagi-Pordany, A. and Belak, S. 1998. Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. *J. Gen. ViroL* 79: 2939-2946.
- Englund, J.A., Anderson, L.J., and Rhame, F.S. 1991. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. *J. Clin. Microbiol.* 29:115-119.
- Falsey, A.R. and Walsh, E.E. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin. Microb. Rev.* 13: 371-84.

- Furze, J., Wertz, G., Lerch, R. and Taylor, G. 1994. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 75: 363-370.
- Gimenez, H.B., Cash, P. and Melvin, W.T. 1984. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates. *J. Gen. Virol.* 65: 963-971.
- Gulati, B.R., Cameron, K.T, Seal, B.S., Goyal, S.M., Halvorson, D.A. and Njenga, M.K. 2000. Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant matrix protein for detection of avian pneumovirus antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4010-4.
- Johnson, P.R., Spriggs M.K., Olmsted, R.A. and Collins, P.L. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5625-5629.
- Juhasz, K. and Easton, A. J. 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75: 2873-2880.
- LeaMaster, B.R., Evermann, J.P., Mueller, M.K., Prieur, M.K. and Schlie, J.V. 1983. Serologic studies on naturally occurring respiratory syncytial virus and *Haemophilus sommus* infections in sheep. *American Association of Veterinary Laboratory Diagnostician* 26: 265-276.
- Lehmkuhl, H.D., Smith, M.H., Cutlip, R.C. 1980. Morphogenesis and structure of caprine respiratory syncytial virus. *Arch-Vir.* 65: 269-76.
- Lerch, R.A., Anderson, K and Wertz, G.W. 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 64: 5559-5569.
- Ling, R. and Pringle, C.R. 1988. Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and in vitro polypeptide synthesis. *J. Gen. Virol.* 69: 917-923.
- Ling, R. and Pringle, C.R. 1989a. Polypeptides of pneumonia virus of mice. I. Immunological cross-reactions and post-translational modifications. *J. Gen. Virol.* 70: 1427-1440.
- Ling, R. and Pringle, C.R. 1989b. Polypeptides of pneumonia virus of mice. II. Characterization of the glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 70: 1441-1452.
- McDougall, J.S. and Cook, J.K.A. 1986. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. *Vet. Rec.* 118: 206-207.
- Oberst, R.D., M.P. Hays, K.J. Hennessy, L.C. Stine, J.F. Evermann, and Kelling, C.L. 1993. Characteristic differences in reverse transcription polymerase chain reaction products of ovine, bovine and human respiratory syncytial viruses. *J. Vet. Diagn. Investig.* 5: 322-328.
- O'Loan, C.J., Allan, G., Baxter-Jones, C and McNulty, M.S. 1989. An improved ELISA and serum neutralisation test for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies. *J. Virol. Meth.* 25: 271-282.
- Paccaud, M.F. and Jacquier, C, 1970. A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch. Ges. Virusforsch.* 30: 327-342.
- Pringle, C.R. 1999 Virus taxonomy at the Xith international congress of virology, Sydney, Australia 1999. *Arch. Virol.* 144/2: 2065-2070.
- Prozzi, D., Walravens, K, Langedijk, J.P.M., Daus, F., Kramps, J A. and Letesson, J.J. 1997. Antigenic and molecular analysis of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 78: 359-366.
- Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R., and A.J. Easton 1997. Rescue of synthetic minireplicons establish the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumoviruses. *J. Virol.* 71: 9849-9854.
- Richter.O.B., Thigpen, J.E., Richter, C.S. and Mackenzie, J.M. 1988. Fatal pneumonia with terminal emaciation in nude mice caused by pneumonia virus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 38: 255-261.
- Rothbarth, P.H., Habova, J.J. and Masurel, N. 1988. Rapid diagnosis of infections caused by respiratory syncytial virus. *Infection* 16:252.
- Seal, B.S. 1998. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Res.* 58, 45-52.
- Seal, B.S., Sellers, H.S., Meinersmann, R.J. 2000. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res.* 66: 139-147.
- Selwyn, B.J. 1990. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: comparison findings from several developing countries. *Rev. Infect. Dis.* 12: S870-S888.
- Shin, H.J., Rajashekara, G., Jirjis, F.F., Shaw, D.P., Goyal, S.M., Halvorson, D.A. and Nagaraja, K.V 2000. Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR. *Arch. Virol.* 145:1239-1246.
- Sullender, W.M. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 1-15.
- Trudel, M., Nadon, F., Sinnard, C., Belanger, F., Alain, R., Seguin, C and Lussier, G. 1989. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. *Arch. Vir.* 107: 141-149.
- Uttenthal, A., Jensen, N.P.B. and Blom, J.Y. 1996. Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds, diagnostic tools and epidemiology. *Vet. Rec.* 139, 114-117.

Valarcher, J., Bourhy, H., Gelfi, J. and Schelcher, F. 1999. Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections. *J. Clin. Microb.* 37: 1858-1862.

Van Milaan, A.J., Sprenger, J.J., Rothbarth, P.H., Brandenburg, A.H., Masurel, N. and Claas, E.C. 1994. Detection of respiratory syncytial virus by RNA-polymerase chain reaction and differentiation of subgroups with oligonucleotide probes. *J. Med. Virol.* 44:80-87.

Vilcek, S., Elvander, M., Ballagi-Pordany, A., and Belak, S. 1994. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *J. Clin. Microb.* 32: 2225-2231.

Walravens, K., Kettmann, R., Collard, A., Coppé, P. and Burny, A. 1990. Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.* 71: 3009-3014.

Weir, E.C., Brownstein, D.G., Smith, A.L. and Johnson, E.A. 1988. Respiratory disease and wasting in athymic mice infected with pneumonia virus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 34: 35-37.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированный метапневмовирус с однонитевой антисмысловой РНК, причем

(i) аминокислотная последовательность белка N изолированного метапневмовируса с однонитевой антисмысловой РНК более чем на 88% идентична аминокислотной последовательности белка N изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 20, где идентичность последовательностей определяется по всей длине белка N;

(ii) аминокислотная последовательность белка P изолированного метапневмовируса с однонитевой антисмысловой РНК более чем на 68% идентична аминокислотной последовательности белка P изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 21, где идентичность последовательностей определяется по всей длине белка P;

(iii) аминокислотная последовательность белка M изолированного метапневмовируса с однонитевой антисмысловой РНК более чем на 87% идентична аминокислотной последовательности белка M изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 22, где идентичность последовательностей определяется по всей длине белка M;

(iv) аминокислотная последовательность белка F изолированного метапневмовируса с однонитевой антисмысловой РНК более чем на 81% идентична аминокислотной последовательности белка F изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 23, где идентичность последовательностей определяется по всей длине белка F;

(v) аминокислотная последовательность белка M2-1 изолированного метапневмовируса с однонитевой антисмысловой РНК более чем на 84% идентична аминокислотной последовательности белка M2-1 изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 24, где идентичность последовательностей определяется по всей длине белка M2-1;

(vi) аминокислотная последовательность белка M2-2 изолированного метапневмовируса с однонитевой антисмысловой РНК более чем на 56% идентична аминокислотной последовательности белка M2-2 изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 25, где идентичность последовательностей определяется по всей длине белка M2-2;

(vii) аминокислотная последовательность белка L изолированного метапневмовируса с однонитевой антисмысловой РНК более чем на 90% идентична аминокислотной последовательности белка L изолята MPV 00-1, как показано на фиг. 28, где идентичность последовательностей определяется по всей длине белка L;

(viii) аминокислотная последовательность белка SH изолированного метапневмовируса с однонитевой антисмысловой РНК более чем на 29% идентична аминокислотной последовательности белка SH изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 26, где идентичность последовательностей определяется по всей длине белка SH; или

(ix) аминокислотная последовательность белка G изолированного метапневмовируса с однонитевой антисмысловой РНК более чем на 29% идентична аминокислотной последовательности белка G изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 27, где идентичность последовательностей определяется по всей длине белка G.

2. Изолированный метапневмовирус с однонитевой антисмысловой РНК, причем изолированный метапневмовирус с однонитевой антисмысловой РНК кодирует по меньшей мере два белка из

(i) белка N, более чем на 88% идентичного аминокислотной последовательности белка N изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 20;

(ii) белка P, более чем на 68% идентичного аминокислотной последовательности белка P изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 21;

(iii) белка M, более чем на 87% идентичного аминокислотной последовательности белка M изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 22;

(iv) белка F, более чем на 81% идентичного аминокислотной последовательности белка F изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 23;

(v) белка M2-1, более чем на 84% идентичного аминокислотной последовательности белка M2-1 изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 24;

(vi) белка M2-2, более чем на 56% идентичного аминокислотной последовательности белка M2-2 изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 25;

(vii) белка L, более чем на 90% идентичного аминокислотной последовательности белка L изолята MPV 00-1, как показано на фиг. 28;

(viii) белка SH, более чем на 29% идентичного аминокислотной последовательности белка SH изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 26; или

(ix) белка G, более чем на 29% идентичного аминокислотной последовательности белка G изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 27,

где идентичность последовательностей определяется по всей длине соответствующего белка.

3. Изолированный метапневмовирус с однонитевой антисмысловой РНК по п.1 или 2, причем

(i) белок N по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности белка N изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 20;

(ii) белок P по меньшей мере на 85% идентичен аминокислотной последовательности белка P изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 21;

(iii) белок M по меньшей мере на 97% идентичен аминокислотной последовательности белка M изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 22;

(iv) белок F по меньшей мере на 97% идентичен аминокислотной последовательности белка F изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 23;

(v) белок M2 по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности белка M2 изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 25;

(vi) белок L по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности белка L изолята MPV 00-1, как показано на фиг. 28;

(vii) белок SH по меньшей мере на 75% идентичен аминокислотной последовательности белка SH изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 26; или

(viii) белок G по меньшей мере на 75% идентичен аминокислотной последовательности белка G изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 27,

где идентичность последовательностей определяется по всей длине соответствующего белка.

4. Изолированный метапневмовирус с однонитевой антисмысловой РНК по п.1 или 2, причем

(i) белок N имеет аминокислотную последовательность белка N изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 20;

(ii) белок P имеет аминокислотную последовательность белка P изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 21;

(iii) белок M имеет аминокислотную последовательность белка M изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 22;

(iv) белок F имеет аминокислотную последовательность белка F изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 23;

(v) белок M2 имеет аминокислотную последовательность белка M2 изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 25;

(vi) белок L имеет аминокислотную последовательность белка L изолята MPV 00-1, как показано на фиг. 28;

(vii) белок SH имеет аминокислотную последовательность белка SH изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 26; или

(viii) белок G имеет аминокислотную последовательность белка G изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 27,

где идентичность последовательностей определяется по всей длине соответствующего белка.

5. Выделенная нуклеиновая кислота, причем

(i) нуклеиновая кислота кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, более чем на 95% идентичную аминокислотной последовательности белка N изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 20;

(ii) нуклеиновая кислота кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, более чем на 85% идентичную аминокислотной последовательности белка P изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 21;

(iii) нуклеиновая кислота кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, более чем на 97% идентичную аминокислотной последовательности белка M изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 22;

(iv) нуклеиновая кислота кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, более чем на 97% идентичную аминокислотной последовательности белка F изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 23;

(v) нуклеиновая кислота кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, более чем на 90% идентичную аминокислотной последовательности белка M2 изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 25;

(vi) нуклеиновая кислота кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, более чем на 95% идентичную аминокислотной последовательности белка L изолята MPV 00-1, как показано на фиг. 28;

(vii) нуклеиновая кислота кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, более чем на 75% идентичную аминокислотной последовательности белка SH изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 26; или

(viii) нуклеиновая кислота кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, более чем на 75% идентичную аминокислотной последовательности белка G изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 27.

6. Выделенная нуклеиновая кислота, причем

(i) нуклеиновая кислота кодирует белок N изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 20;

(ii) нуклеиновая кислота кодирует белок P изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 21;

(iii) нуклеиновая кислота кодирует белок M изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 22;

(iv) нуклеиновая кислота кодирует белок F изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 23;

(v) нуклеиновая кислота кодирует белок M2 изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 25;

(vi) нуклеиновая кислота кодирует белок L изолята MPV 00-1, как показано на фиг. 28;

(vii) нуклеиновая кислота кодирует белок SH изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 26; или

(viii) нуклеиновая кислота кодирует белок G изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 27.

7. Выделенная нуклеиновая кислота, специфично гибридизующаяся в условиях высокой жесткости с нуклеиновой кислотой по п.5 или 6.

8. Выделенная нуклеиновая кислота по п.7, причем нуклеиновая кислота состоит по меньшей мере из 10 нуклеотидов, по меньшей мере из 25 нуклеотидов, по меньшей мере из 40 нуклеотидов, 18 нуклеотидов, 19 нуклеотидов, 20 нуклеотидов, 21 нуклеотида, 22 нуклеотидов, 24 нуклеотидов или 25 нуклеотидов.

9. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеиновую кислоту по пп.5, 6 или 7 и вторую нуклеиновую кислоту, причем вторая нуклеиновая кислота кодирует белок парамиксовируса, отличного от метапневмовируса млекопитающего.

10. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.5, 6, 7, 8 и 9.

11. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп.5, 6, 7, 8 и 9 или вектор по п.10.

12. Изолированный метапневмовирус с однонитевой антисмысловой РНК, причем геном вируса содержит нуклеотидную последовательность по пп.5, 6, 7, 8 или 9.

13. Инфекционный химерный вирус, содержащий

(a) непрерывную область по меньшей мере из двух т.п.н. вируса по пп.1, 2, 3, 4 или 12; и

(b) последовательность отличного вируса.

14. Инфекционный химерный вирус, содержащий геном вируса по пп.1, 2, 3, 4 или 12, где одна или несколько открытых рамок считывания вируса заменены аналогичными открытами рамками считывания из APV или RSV.

15. Инфекционный химерный вирус, содержащий геном APV, где одна или несколько открытых рамок считывания в геноме APV заменены аналогичными открытими рамками считывания из MPV млекопитающих.

16. Вирус по любому из пп.1, 2, 3, 4 и 12, где вирус представляет собой рекомбинантный или аттенуированный вирус.

17. Вирус по любому из пп.1, 2, 3, 4 и 12, где вирус способен инфицировать человеческую клетку.

18. Вирус по любому из пп.1, 2, 3, 4 и 12, где вирус способен инфицировать клетку млекопитающего.

19. Иммуногенная композиция, содержащая вирус по любому из пп.1, 2, 3, 4 и 12.

20. Выделенный белок, содержащий

(i) белка N, более чем на 88% идентичного аминокислотной последовательности белка N изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 20;

(ii) белка P, более чем на 68% идентичного аминокислотной последовательности белка P изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 21;

(iii) белка M, более чем на 87% идентичного аминокислотной последовательности белка M изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 22;

(iv) белка F, более чем на 81% идентичного аминокислотной последовательности белка F изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 23;

(v) белка M2-1, более чем на 84% идентичного аминокислотной последовательности белка M2-1 изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 24;



где идентичность последовательностей определяется по всей длине соответствующего белка.

24. Антитело, специфично связывающееся с

- (i) белком N изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 20;
- (ii) белком Р изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 21;
- (iii) белком М изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 22;
- (iv) белком F изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 23;
- (v) белком М2 изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 25;
- (vi) белком L изолята MPV 00-1, как показано на фиг. 28;
- (vii) белком SH изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 26; или
- (viii) белком G изолята MPV 00-1 или 99-1, как показано на фиг. 27.

25. Способ определения метапневмовируса млекопитающего в образце, предусматривающий взаимодействие указанного образца с антителом по п.23 или 24 или нуклеиновой кислотой по пп.5, 6, 7 или 8.

26. Способ по п. 25, предусматривающий ПЦР.

27. Способ по п.25, где MPV млекопитающего представляет собой MPV человека.

28. Вирусный изолят, идентифицируемый посредством способа по п.25 как вирус млекопитающего с однонитевой антисмысловой РНК, принадлежащий к подсемейству Pneumovirinae семейства Paramyxoviridae и идентифицируемый как филогенетически соответствующий роду *Metapneumovirus*.

29. Способ серологической диагностики инфекции MPV у млекопитающего, предусматривающий определение присутствия специфически направленного против MPV или его компонента антитела в образце от указанного млекопитающего посредством взаимодействия указанного образца с белком по любому из пп.20, 21 и 22 или вирусом по пп.1, 2, 3, 4, 12 или 16 или его частью.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и одно или несколько из следующего:

- (i) изолированный вирус млекопитающего с однонитевой антисмысловой РНК по пп.1, 2, 3, 4, 12 или 16 или его часть;
- (ii) нуклеиновая кислота по пп.5, 6, 7 или 9 или его фрагмент;
- (iii) белок по пп.20, 21 или 22 или его фрагмент; или
- (iv) антитело по п.23 или 24 или его фрагмент.

31. Диагностический набор для диагностики инфекции MPV, содержащий

- (i) изолированный вирус млекопитающего с однонитевой антисмысловой РНК по пп.1, 2, 3, 4, 12 или 16 или его часть;
- (ii) нуклеиновая кислота по пп.5, 6, 7 или 9 или ее фрагмент;
- (iii) белок по пп.20, 21 или 22 или его фрагмент; или
- (iv) антитело по п.23 или 24 или его фрагмент.

32. Изолированный вирус млекопитающего с однонитевой антисмысловой РНК по пп.1, 2, 3, 4, 12 или 16 или его часть; нуклеиновая кислота по пп.5, 6, 7 или 9 или ее фрагмент; белок по пп.20, 21 или 22 или его фрагмент; антитело по п.23 или 24 или его фрагмент; или фармацевтическая композиция по п.30, применимые в качестве лекарственного препарата.

33. Применение изолированного вируса млекопитающего с однонитевой антисмысловой РНК по пп.1, 2, 3, 4, 12 или 16 или его части; нуклеиновой кислоты по пп.5, 6, 7 или 9 или ее фрагмента; белка по пп.20, 21 или 22 или его фрагмента; антитела по п.23 или 24 или его фрагмента; или фармацевтической композиции по п.30 для производства лекарственного препарата для лечения или профилактики респираторного заболевания.

34. Применение изолированного вируса млекопитающего с однонитевой антисмысловой РНК по пп.1, 2, 3, 4, 12 или 16 или его части; нуклеиновой кислоты по пп.5, 6, 7 или 9 или ее фрагмента; белка по пп.20, 21 или 22 или его фрагмента; антитела по п.23 или 24 или его фрагмента; или фармацевтической композиции по п.30 для производства лекарственного препарата для лечения или профилактики заболевания птиц.

35. Способ определения метапневмовируса млекопитающего в образце, предусматривающий

- (i) взаимодействие клетки с образцом;
- (ii) мониторинг цитопатического эффекта на клетку, и если цитопатический эффект сходен с цитопатическим эффектом hRSV и hPIV, тогда
- (iii) тестирование на наличие PIV, вируса гриппа и RSV, причем отсутствие в образце PIV, вируса гриппа и RSV означает присутствие в образце метапневмовируса млекопитающего.

36. Способ определения метапневмовируса человека в образце, полученном от человека, предусматривающий

- (i) взаимодействие клетки с образцом;
- (ii) мониторинг цитопатического эффекта на клетку, и если цитопатический эффект сходен с цитопатическим эффектом hRSV и hPIV, тогда
- (iii) тестирование на наличие hPIV типа 1, hPIV типа 2, hPIV типа 3, hPIV типа 4, hRSV, вируса гриппа типа А и вируса гриппа типа В, причем отсутствие в образце hPIV типа 1, hPIV типа 2, hPIV типа

3, hPIV типа 4, hRSV, вируса гриппа типа А и вируса гриппа типа В означает присутствие в образце метапневмовируса человека.

37. Способ определения метапневмовируса млекопитающего в образце, предусматривающий

(i) взаимодействие клетки с образцом;

(ii) мониторинг цитопатического эффекта на клетку, и если цитопатический эффект сходен с цитопатическим эффектом hRSV и hPIV, тогда

(iii) тестирование на наличие Paramixovirinae, hPIV типа 1, hPIV типа 2, hPIV типа 3, hPIV типа 4, вируса Сендаи, обезьяньего вируса типа 5, вируса ньюкаслской болезни, hRSV, вируса кори, вируса эпидемического паротита, вируса Nipah, вируса Hendra, вируса Tupaia и вируса Маруега, причем отсутствие в образце Paramixovirinae, hPIV типа 1, hPIV типа 2, hPIV типа 3, hPIV типа 4, вируса Сендаи, обезьяньего вируса типа 5, вируса ньюкаслской болезни, hRSV, вируса кори, вируса эпидемического паротита, вируса Nipah, вируса Hendra, вируса Tupaia и вируса Маруега означает присутствие в образце метапневмовируса млекопитающего.

38. Способ по пп.35, 36 или 37, где цитопатический эффект характеризуется образованием синцития и последующим быстрым внутренним разрушением с последующим отделением клетки от монослоя.

39. Способ по пп.35, 36 или 37, где клетка проявляет цитопатический эффект через три пересева после взаимодействия клетки с образцом.

40. Способ по пп.35, 36 или 37, где клетка представляет собой клетку tMK, клетку VERO или клетку A549.

41. Способ по пп.35, 36 или 37, где указанная стадия тестирования предусматривает определение нуклеиновой кислоты PIV, RSV и/или вируса гриппа.

42. Способ по п.41, где указанная стадия тестирования предусматривает анализ RT-PCR в условиях низкой жесткости.

43. Способ по пп.35, 36 или 37, где указанная стадия тестирования предусматривает определение белка PIV, RSV и/или вируса гриппа.

44. Способ по п.43, где указанная стадия тестирования предусматривает иммунофлуоресцентный анализ.

45. Способ по пп.35, 36 или 37, где цитопатический эффект идентичен цитопатическому эффекту hRSV или hPIV.

46. Способ по любому из пп.35-45, дополнительно предусматривающий способ по пп.25, 26, 27 или 29.

Таблица 1

M							
	00-1	hRSV	bRSV	PMV	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,37	0,37	0,37	0,77	0,87	0,75
hRSV	---	1,00	0,91	0,41	0,37	0,37	0,37
bRSV	---	---	1,00	0,42	0,35	0,36	0,35
PMV	---	---	---	1,00	0,37	0,38	0,38
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,78	0,89
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,77
APV-B	---	---	---	---	---	---	1,00
N							
	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,20	0,22	0,21	0,40	0,52	0,40
hRSV	---	1,00	0,59	0,30	0,18	0,21	0,18
bRSV	---	---	1,00	0,31	0,21	0,23	0,21
PVM	---	---	---	1,00	0,21	0,23	0,21
APVA	---	---	---	---	1,00	0,42	1,00
APVC	---	---	---	---	---	1,00	0,42
APVB	---	---	---	---	---	---	1,00
F							
	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,32	0,33	0,37	0,67	0,80	0,66
hRSV	---	1,00	0,82	0,40	0,35	0,35	0,35
bRSV	---	---	1,00	0,41	0,34	0,36	0,34
PVM	---	---	---	1,00	0,38	0,38	0,39
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,72	0,84
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,72
APV-B	---	---	---	---	---	---	1,00
P							
	00-1	hRSV	bRSV	PMV	APV-A	APV-C	
00-1	1,00	0,25	0,26	0,27	0,55	0,67	
hRSV	---	1,00	0,81	0,30	0,28	0,26	
bRSV	---	---	1,00	0,29	0,28	0,26	
PMV	---	---	---	1,00	0,23	0,27	
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,52	
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	
L8							
	00-1	hRSV	bRSV	APV-A			
00-1	1,00	0,36	0,35	0,56			
hRSV	---	1,00	0,79	0,36			
bRSV	---	---	1,00	0,35			
APV-A	---	---	---	1,00			
L9/10							
	00-1	hRSV	bRSV	APV-A			
00-1	1,00	0,30	0,30	0,53			
hRSV	---	1,00	0,83	0,34			
bRSV	---	---	1,00	0,32			
APV-A	---	---	---	1,00			

Фиг. 1а

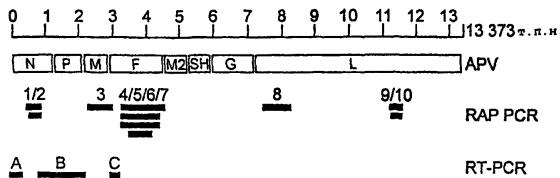
Таблица 2

Доминирование серотипа hMPV у людей, распределенных по возрастным группам, с использованием иммунофлуоресцентного анализа и анализа нейтрализации вируса

Возраст (лет)	Иммунофлуоресцентные анализы		Анализы нейтрализации вируса		
	число тестированных	число положительных	число тестированных	число положительных	диапазон титров
<1	20	5	12	3	16-32
1-2	20	11	13	4	16-32
2-5	20	14	8	3	16-512
5-10	20	20	4	4	32-256
10-20	20	20	4	3	32-128
>20	20	20	4	3	32-128
8-99 <sup>1</sup>	72	72	11	11	16-128

<sup>1</sup>Сероархеологический анализ с применением коллекции сывороток в 1958 г.

Фиг. 1б



ФИГ. 2

## Нуклеопротеин

00-1 NP	MSLQGIIHLSDLSYKQWAIKESQYTIKRDVGTTAVTPSSLQCEITLLCGEILYAKHADYKQAEIGIQYISTALGSEVQVVLIRTYSL	10
APV A	...ES.R...E...ED...R...A...I...E...PQVST...MV.F...T...EP...V.M...AD.T...K...G.M.KIVT.	10
APV B	.....Q.....R.VS.....T.SH...V.M...V.T.A.T...K...A...K...	10
APV C	.....Q.....R.VS.....T.SH...V.M...V.T.A.T...K...A...K...	10
BSRV	..A.SKV.K.N.TIN.DQL.ST.K...Q.ST.DNDIDPMDV.KHLNK..ML.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTAK..KDA.YQ.RANGVDWTH	10
HSRV	..A.SKV.K.N.TIN.DQL.SS.K...Q.ST.DNDIDPMDV.KHLNK..ML.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTAK..KDA.YH.RANGVDITTY	10
PVM	..CRLK.N.V.N.DSL.SNCK.SVT.ST.DV.S.SGHM.KALARTL.HF.LTAFNRCEEV...L.AMSL.ROOSTK...EA.YN.KC.D.QKDF	10
00-1 NP	GCKKNNKGEDIQLMQLDINGVKEWSWVEEIKCERKTHATLKESSGNIPQNQRSPADTPPIIILLCVGALLFTKLASTIEVGLETTVRRANRVLSDALKYPR	20
APV A	SAEGSVRKREY...N..D.GVG.ADDVERIT.EA.GAMVR.KV-QLTK..K..L.A.V...I.....V...AI...S...IS...	19
APV B	..G..S...E.....R..I..V.....SAT..EN..P.....S..A.....I.....A.....N...F..	20
APV C	..G..S...E.....R..I..V.....SAT..EN..P.....S..A.....I.....A.....N...F..	20
BSRV	RQDV.G.EPKFEV.TLSSLTSEIQVN.EI.S..SYKRM..M..EVAPY.E.HDS..CGM.V..A..VI...AGRS..TAVI...N..BNEM...KG	19
HSRV	RQDI.G.ENKFEV.TLSSLTSEIQVN.EI.S..SYKRM..M..EVAPY.E.HDS..CGM.I..IA..VI...AGRS..TAVI...N..RNEM...KG	19
PVM	TTKLOG.EYK.I.V...V.IDPANALADLEIQ..GVV.KE..TG-ARL.D.R.HD..CGV.V..IA..VVS..AGORG..DRVE..LN..RNEOL..N	19
00-1 NP	MDIPICLARSFYLQFILFEQKVKYHRSLFIEYGRALGSSSTGSKAESL.FVNI.FQAYGAGGDCRNGVIARSSNNIMLGHVSYOELKQVTEVYDLYRZGPGESG	30
APV A	....R..K..FE...K..Y.N...T..RM.....R..S...K...	29
APV B	I.....Y.....	30
APV C	I.....Y.....	30
BSRV	LIPKD..N...EV..KYPHYIDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N...V...L.K.VK...A...ME..V...EYDQKL.G.A.	29
HSRV	LIPKD..N...EV..KOPHILIDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N...S..V...L.K.VK...A...ME..V...EYDQKL.G.A.	29
PVM	.EVHQ..E...R.P.YIDV..TF.L.QS.VRG...V.G..SGL..N...V...LL.K.VK...A...ME..V...EYDQKL.G.A.	29
00-1 NP	LILHQSPMIGLLEIACNPNTFASVVLGRASGLIIGMTRGRVPNTLFSMAESYNSLKESENKINFSSLGLDEEKENAEHFLIVSDSGQNDYE	39
APV A	.....T.....A.....K..A..L..A...RT.R..N...IAA...D.R...TSY.GGD.EASSKF.	39
APV B	.....N.....L.....A.....R.....E.....N...IMEEG....	39
APV C	.....N.....L.....A.....R.....E.....N...IMEEG....	39
BSRV	TY.IIINN...S...TOP..S.....A...ME..TPR.QD.YD..KA.EQ..NGV..Y.V.D..T..L..IRHQ..PK.N..DVEL	39
HSRV	TY.IIINN...S...TOP..S.....A...ME..TPR.QD.YD..KA.EQ..NGV..Y.V.D..A..L..IRHQ..PQE..DVEL	39
PVM	TY.I.IINN..S...T.....A.....S.K.APR.R..D..KD..ER..DN.V..Y.A.N..A..R.LISQQ..IV..TPD.DZ	39

## Фосфопротеин

00-1 P	MS-FPEGKDIILEMGNEAAKLAZF-----OKSLRKPGHURSQSIIGEKVNTVSETLELPTISRPKPTIPSEPKLANTDRGGATKTEIKQAIKVDP	91
APV-A	...-...M..S...M.D.Y-----R..NTSAG-GR..S..PI..IA.KV..PLCN.TT-----SCI.PNGAPVP..K--	76
APV-C	...-...L.....A.....R..K.I..R.T..V.D.II....V.K...KST.V.T.P.R.N..GE.PUT.RSQTEE.RNEAT.	91
BSRV	-----	80
HSRV	.EK.APE---.H.ED.NHK.TK.LES-----INGKE-----ASSKOPKK.DS.ISVNS	45
PVM	.EK.APE---.V.ED.N.K..E.LGHRSPFSE.P.AGIPNTATHVTKYNMPPILRSSEK..SPRVA.KL.E..A---PTTPPP.PPQH.EQQPQESD	92
00-1 P	IEERESTEIKVLPSSDGKTPAEKKLKPSTNT-----KKGVSFTPNPE-----GKYTKLEKADLLSNEEDAE-SSILTTEE-----ROTSSLSIEARLESIE	18
APV-A	--...I.Y.P..LPIEAPVATDTTYSSTSTE.AKK-----S...K..LNPKV-----EGG.E...F..IND.K...--K..A.T...A..	16
APV-C	EDASRLY.EVA.T.....GKTEPKP-----T..KND.S-----R...ME..E...DD...V...--K..A..L.....D	18
BSRV	-----	16
HSRV	.DI.VTK..SPITSGNIXM..TSEADSTPETHKQYPR..PL...KEDLTPSDNPFS..Y.EYIETF-----DNN...EE.SVSY..INDQ..NDM.T..DR.D	13
PVM	VDI.TMVC..PDPNPKKPCSDQDQD.KNT-----R..PM..T..VFP..EKFV..LGAS..YRSTQTF-----ADDYIDES.N.S..TMQEPG.S.V.Q..DR..	18
00-1 P	EKLISMLGLRTLNLTAGPTAARDGIRDANIGWREELIADYIKEA-----KKAQAE-----HEEDKQKSKIGNSVILTEKARELNKIVEDESTSGESEE	27
APV-A	.....M.K.....M...NS.MT...D.I...K..DT..A..D.....L..Q.S...S.	25
APV-C	.....V.....V.L.....K..AK.K.....G.....	27
BSRV	-----	26
HSRV	...E..M..N..VV..S...S.....V.L..M.EK.RA..LMTHDRLE.ARHN..SEKHA..DTSD..P.NP73..K.SDII..N	23
PVM	....Y..I..N..IMV....T..E..L..T...EM.KSDILTVNRIVA.EKGRD..CSNADTDOGSACY..DR.RI.D..SNA	27
00-1 P	EEPKDTQDNQEDOQI-----CLIM.	29
APV-A	..SCESESDEE.S..NLDL..L	28
APV-C	..E..EEESNPD..L..SLTM..LTON	29
BSRV	-----	28
HSRV	...SONDLSL...DF.	24
PVM	...EKAEDLQD...NGINP..LL	29

ФИГ. 3

## Матриксный белок

## Белок слияния

00-1 F NSW—KVIKXFSLLI—TPXHGLKESYLESCSTTIGEYSLVRLIGTIVNFTLEGVENLTCADGPS—LITELDOLTSALSAEIRTVSADQ 88  
 APV-A .DV—RICLLIP. IS—N. SSCIQ.T. ....V.R. K. ....N. I. N. ....I. N. ....D. ....V. ....N. ....K. .... 88  
 APV-B .YL—.LILLIY. VV—GASGKIQ.T. S. ....V.R. K. ....N. I. N. ....I. N. ....S. ....S. ....Q. .... 88  
 APV-C . ....LILIV. A—TG. E. ....Y. V.R. ....T. ....R. ....E. ....N. ....B. ....K. .... 88  
 DRSV .ATTAGRN. SIIFFSTYVTH. LCCNIT. EFGST. AVSR. .A. ....S. V. I. LSKQCNQV. KSTD. RVK. ....Q. ....E. RYNN. VV. ....Q. .... 10  
 HSIV .ELIYVRLA. I. T. AINRUL. SCSNT. EYQST. AVSR. F. A. ....S. I. I. LSNKETK. NGTUVVK. ....Q. ....K. ....N. ....V. ....Q. .... 10  
 FVW . ....FPG. FLY. ....VPIKTPHPT. T. R. Y. ST. ....V. E. A. K. A. ....RMT. MTSKLQSQINIES. KSSN. ....L. ....A. ....YVS. ....V. ....D. ....L. ....SNA 93

00-1 F LAREQQ	IEPPQSGRIVLGAIAGVAAVIGVAAVIAKTRLESEVTAIKAGKICNEAVSTLGNQVRLPACRELIK	16
APV-A V.K.SR	LSS.. RR.....L.....G.K.....RE.....ED.....	16
APV-B ITK.NR	LSS.. RK.....T.....L.....G.K.....L.RS.....I.....ED.....	16
APV-C ..K.AR	MS.. KA.....G.A.....G.R.....	16
DRSV P.SFSRAGGIPELHYTRNSTKFGYLMGNK.KR	L=GEF.. IG=S.. AS.. VS.VLM.. G.NK....IS..K..VS.S.. S..TSK.LD..	19
RSV P.AH2R3BEEAPQDNTTNTTQHUVS.KR	L=GEL.. IG=S.. IS..L..VS.VLM.. G.NK....IS..K..VS.S.. S..TSK.LD..	19
FVH	LSSK.. RK.. L=GL.. LG.....L.. VQ.....I AL RD.. VRN.. VS.T.. MS.. KV.DO..	16

00-1	F	DFVSIG TRAINNQNCIDIADLQMSVFSQFNNRFLVNRQFSCNAGTPIASLDLNTDAELARAVENHPTSAQGQ1K1M1ENRAHVRKRGPGFLIGVQSS	26
APV-A	E..I..K..P..Q..N..I..I..G..N..	.....S..S.V.....S..D..V..INR.....S..S..N.....I.....DT	26
APV-B	E..I..K..P..Q..N..I..I..G..N..	.....S..S.V.....S..V..INR.....S..S..N.....I.....GT	26
APV-C	E..I..K..P..Q..N..I..I..G..N..	.....S..S.V.....S..V.....S..S..N.....I.....I	26
DRSV	NYID..E..LPVQ..NNHD..R..SNITIEV..Q..K..N..L..EIA..E..V..T..PL..TYM..NS..LISIND..ITND..K..S..6..VQI..COSYSNTN..REEV	29	
HRSV	NYINQ..E..LPVQ..QOS..R..SNITIEV..Q..K..N..L..EIA..E..V..V..TPL..TYM..NS..LISIND..ITND..K..S..6..VQI..COSYSNTN..REEV	29	
PVM	N..I..E..LPK..RVS..VH..ITAVIR..Q..L..K..L..E..S..E..S..L..LHTV..SYM..A..T..T..GG..AV..N..REI..SK..IM..N..LAI..S8..HAD	26	

00-1 F	VIKAVLPLPVGIVDTPCNIVKAAPSC- -SGKIGNYACLLRQDGQHNTQAGPSTVYPPNEKOCETGHDWTCDAIGINVAEQSKXEHINISTINTPKV	36
APV-A	.VY.....E.....R.V.....L.....RKE.....I.....T.....T.....A.....KD.....D.V.Y.....	36
APV-B	.VY.....E.....R.V.....L.....RHERES.....T.....T.....A.....D.....V.D.Y.....	36
APV-C	.VYI.....K.....K.....L.....L.....D.....D.....T.....T.....E.....V.S.....	36
DRSV	IAYV.....K.....KHAITS.....L.....TTIN.....E.....SNT.....T.....T.R.....D.....	39
RSV	IAYV.....Y.....KHAITS.....L.....TTIN.....E.....SNT.....T.....T.R.....D.....	39
PVM	LIVVII.....L.....M.....D.....VIRSSID.....KNAICK.....A.....A.N.....H.....LS.....P.SY.....HSNGTA.....LNSLT.....P.VT.R.....S.MY.....D.I.....	35

00-1 F ESTENSQVLDVSNNILS	SACNGTWGFIY-VIIILAVLGSTNLVSVIIINKTRPFGAP-PELGQVTRNGITPH-W.	54	
APV-A	...DR. D. K. I. DL-G	ADL SVA IA...A-VVLL...IFPL AVVYCSVR. TKGMDY. ATT. BSSWVY...	53
APV-B	...VDK. KJ. K. D. DL-D	IEV. S. I. AA-L. ATLV. SMLI. VGLAYTTV. R. KNGY. RT. QN. M. Y. S.	53
APV-C	...V. K. M. I. ...K. D.	...I. A. V. ...V. V. M. V. M. V. G. F. V. R. JAPK. M. MN. N. K. ...-P. L. L. Q. Q. Q. Q. K. K. K.	55
BSV	AK. NQ. L. FTR. DEL. H-	SDVQG ST. NVN. TTI. V.V. V. V. M. A. GLFCY. TXST. IMLGQD. . . . IN. LS. S- . . . . K.	57
BSV	K. NQ. L. FTR. DEL. H-	MWVQG ST. NVN. TTI. V.V. V. V. M. A. GLFCY. ANGT. VLSQD. . . . IN. LS. S- . . . . K.	57
FWM	R. KQTRTTFKA. DQL. DLSRGNED. WLSKY. LITLFWHM. III. XVGFLFVLYK. KURDNK. KRSST. LI-	VLS	53

Фиг. 3, продолжение

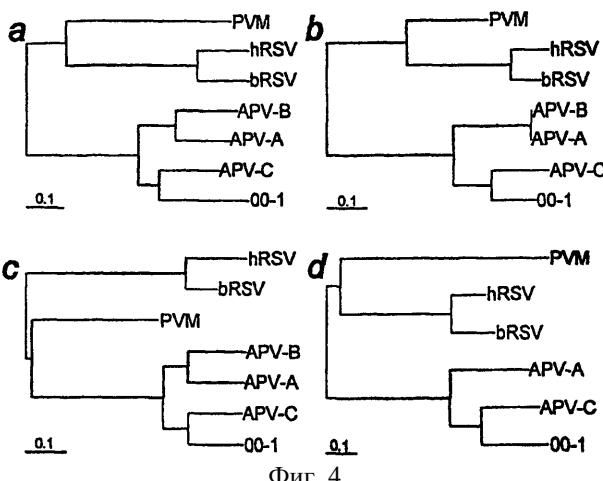
Фрагмент 8 L-полимеразы, полученный  
посредством RAP-PCR

00-1 фрагмент 8	—TVNVYLPOSYLNQVISFSETNAIGSCLLGPYIQLDQNTAKVAINPVIKHLVRLKNAVSKGQISDYK—	—IEPVWQKQ 77	
APV-A	ME-1SNESV.....V.N...I.D.Y.H..M.T.....Q..PALK..LTISRE.R.....V...IAG.K.	84	
bRSV	KOTLHNST....T.....C..L..Y..DG.....Y..NLSRQK.L...IN..KLSIQSFVTK.NKGELGLE..TYF.SL	90	
hRSV	MDPIIINGSA....T.G.....C..L..YING.....Y..NLSRQ..L...MN..KLNITOSL..K.HGEKXLE..TYF.SL	90	
00-1 фрагмент 8	IM—KWHSCEL—TLLNQFLTRSIQNTIKLHNICDNLQLK—	—GTSDDTSILSFIDVEFI—	13
APV-A	LL—.WAGAR.—KK..K.W.G..D..EV..K.VI..K.S—Q..PGRK..IDR.Q..NQ—	13	
bRSV	L..TY..SLLTS..ITTT..F..KIR..AIE..DV..VYA..LNK.G..EKGVDRC—DDTN..TLSNIVARNLNSVLSNTFSTGPNSCK	17	
hRSV	L..TY..SNT..S..QIATTN..KIR..AIE..DV..VYA..LNK.G..EKGKIKSNNGQDE..NSV..TTI..KDDILSAVKDNOSHIGDQGSTK	18	
00-1 фрагмент 8	—PS4VSNWESMVMNLNKLLIEPLKEEVEITGSI—	—CRSLGKLVFVSSYGCIVKSNSKGRVSFFTYDQI 20	
APV-A	—D..LCH..DS..LI..DV..QSY..CL..SO..SA..—RK..SLNFF..A..F...II..R..R..IC..C.....	20	
bRSV	PDQPIKTTILCGLSSNSHP..T..LW..NLYTK..DILTYK..TN..ARNH..Y..IDT..T..EQQ..ILNQ.....YH..L..KTTT..F..	26	
hRSV	OKOTIKTTLLQKCMCSMOPF..L..LW..NLYTK..NLYTN..SM..KRN..FT..IDMOT..SGEQ..ILNQ.....YH..KEL..TWT..F..	27	
00-1 фрагмент 8	—TMDVYLSLRFLWYTCIIVNSLHENVQGVLGSLN—	—Q 23	
APV-A	....LA.....L.V....C..SA..D.L...K..VGEELLR	24	
bRSV	....IS...L..VCHIT..I..C..TINKSL..C	30	
hRSV	....IS...L..VCLIT..I..C..TINKSL..	30	

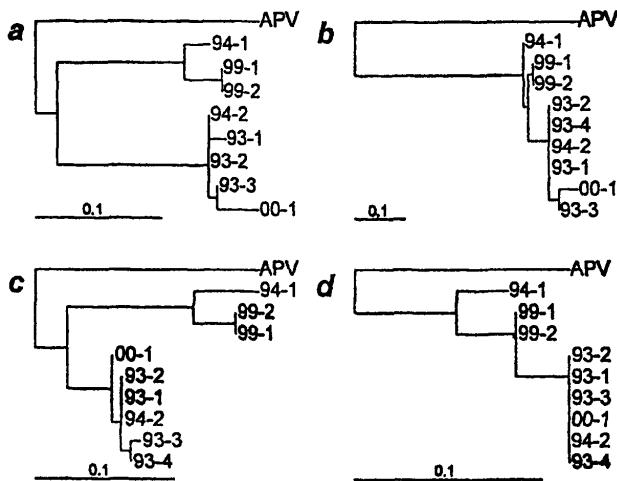
Фрагмент 9/10 L-полимеразы, полученный  
посредством RAP-PCR

00-1 фрагмент 9/10	—KLVQDKITSQHIFSPDKIDMILTLGKMLP—TIKQKTDQ—	—FLNKRENYFHGNLIESLSAALAKHNGGILYEDC 72
APV-A	—F..S.R..VT....N..H..LVM...L.L.—.VRSNINNN—	KPAT..F..N...IV..A..TSC..C...TV..ILLT 72
bRSV	—ICKLQVQVQK..M..L...SLSQYVELFLSNK..L..NSPHISSNVLVH..MSD..LHKVY—..TN..G..IM..IQMK	76
hRSV	DIHKLKQVQK..M..L...SLTQYVELFLSNK..L..SGSHVMSNLILAH..ISD...NTYI—..TN..G..IL..IQMK	77
00-1 фрагмент 9/10	—IENNIFQKWDWDCGFISDQHAYDQFKIFLCLVFKTLLC	— 10
APV-A	—T..S..Q..E.....T....IN..TW..MS...Y...HM	11
bRSV	DSKG..E....E.Y..T..M..L..LNV..FDAY..Y.	11
hRSV	DSKG..E....E.Y..T..M..D..L..V..FNAY..Y	11

Фиг. 3, продолжение



Фиг. 4



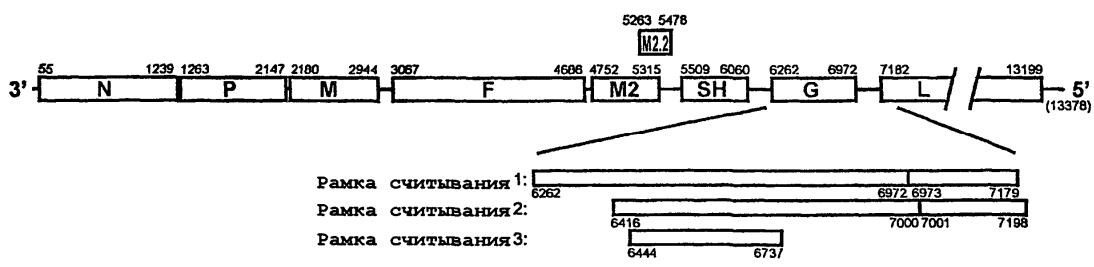
Фиг. 5

Фиг. 6А

Фиг. 6В

ATAAGCTAGTACATAAGATAACTCTCTATACACATATCTCTAGTCAGACAGAAAATAGATATGTTAACACTGGGAAAATGCTCATGCCCATATAAAAGGTCAAGAACAGATCACTTCTGCAAGAACAGAGAAGAATTATTCATGCC  
K L V D K I T S D O H I F S P D K I D R L T L G K H L R P T I K B G K T D B F L F N K R E H Y F H G  
ATAATCTTATTGATCTTGTCTGAGACGTTAGCTGTCTGGGATATTAAACACAGAACATGTTATGAAATAATTTCTCAAGAAABACTGGGTTAACCGGTCTATCTGGATCATGCTTTATGGACTCTAACAAATTATGCTAT  
K H L I E S L S A A L A C H V E C G I L T E O C I E H N I F K K D W B D S F I S D H A F H D F K I F L  
GTCCTCTAAACAACTTTTATGTA 327  
C V F K T K L L C

Фиг. 6С



Фиг. 7

HMPV MSLQGIHLSDSLQYKAILKESQYTIKRDVGTTAVTPSSLQQEITLLCGE  
 APVC .....Q.....R.VS.....  
 APVB ...ES.R....E....D....R....A...I...E..PKVST...M  
 APVA ...ES.R....E....ED....R....A...I...E..PQVST...M  
 HRSVA .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DSIDTPNYDV.KH.NK...M  
 HRSVB .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DNIDTPNYDV.KH.NK...M  
 BRSV .A.SKVK.N.TFN.DQL.ST.K...Q.ST.DNIDIPNYDV.KH.NK...M  
 PVM ...DRLK.N.V.N.DSL.SNCK.SVT.ST.DV.S.SGHAM.KALARTL.M

HMPV ILYAKHADYKYAAEIGIQYISTALGSEVQQILRNSGSEVQVLLRTYSL  
 APVC .....T.SH...V.M..V..T..A..T...K.....A..K...  
 APVB ...F....EP..QV.M.....ADKT...KS.....G.M.KIVT.  
 APVA V.F....T..EP...V.M.....AD.T...K.....G.M.KIVT.  
 HRSVA L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTIK...DA.YH.KANGVDVITH  
 HRSVB L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTIK..KDA.YH.KANGVDITTY  
 BRSV L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTLK..KDA.YQ.RANGVDVITH  
 PVM F.LTAFNRCEEV...L..AMSL..RDDSIK..EA.YN.KC.D.QLKDF

HMPV GKTNNKGEDLQMLDINGVEKSWVEEIDKEARKTMATLKLKESSGNIPQNO  
 APVC ..G..S..E.....R..I..V.....SAT.DN..P.....  
 APVB PAEGPIR--KREV.N..DIGPA.ADNVERT..E..SLMV..K-AQ..K..  
 APVA SAEGSVR--KREV.N..D.GVG.ADDVERTT.EA.GAMVR.K-VQLTK..  
 HRSVA RODI.G.EMKFEV.TLASLTTEIQIN.EI.S..SYKKM..M..EVAPEY  
 HRSVB RQDI.G.EMKFEV.TLSSLTSEIQUV.EI.S..SYKKM..M..EVAPEY  
 BRSV RQDV.G.EMKFEV.TLVSLTSEVQGN.EI.S..SYKKM..M..EVAPEY  
 PVM TIKLQG.EYKI.V..V.IDAANLADLEI.Q..GVV.KE..TG-ARL.D.R

HMPV RPSAPDTPIEELCVGALIETKIASTIEVGLETTVRRANRVLSDALKRTRR  
 APVC ...S..A.....I.....A.....N.....F..  
 APVB K...L.A.V. I.....V.....AI..S.....IS...  
 APVA K...L.A.V. I.....V.....AI..S.....IS...  
 HRSVA .HDS..CGM.I..IA..VI...AGDRS..TAVI...N..KNEM...KG  
 HRSVB .HDS..CGM.I..IA..VI...AGDRS..TAVI...N..KNEI...KG  
 BRSV .HDS..CGM.V...A..VI...AGDRS..TAVI...N..RNEM...KG  
 PVM .HD...CGV.V..IA..VVS..AGDRG..DAVE..LN..KAEKA..N

HMPV MD1PKIARSEYD1FEQK0VHRS1C1P25KBLGSSSTG92KESL5HNEC  
 APVC I.....Y.....  
 APVB ....R..K..FE..K..Y.N.....T.S..RM.....  
 APVA ....R..K..FE..K..Y.N.....T....RM.....  
 HRSVA LIPKD..N...EV..KHPHFDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N  
 HRSVB LIPKD..N...EV..KHPHLIDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N  
 BRSV LIPKD..N...EV..KYPHYIDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N  
 PVM .EVKQ..E.....R.P.YIDV..TF.L.QS.VRG...V.G..SGL..N

HMPV AYGASQTMRLRGV IARSSNNIMLGHV VQAELKQWEEVYDNRHMGPEEG  
 APVC .....  
 APVB .....R..V.....R..S.....K.....  
 APVA .....R..S.....K.....  
 HRSVA ....V.....L.K.VK....A...ME..V...EYAQKL.G.A.  
 HRSVB ...S..V.....L.K.VK....A...ME..V...EYAQKL.G.A.  
 BRSV ....V.....L.K.VK....A...ME..V...EYAQKL.G.A.  
 PVM ...V.....L.K.VK....A...ME..V...EYAOKO.G.A.

HMPV LAIH1RQSPKAGILSLANCPEASWLNQASLIGIGYTRGRVPTELFSA  
 APVC .....N.....L.....A.  
 APVB .....TS.....A.....K..A..L....  
 APVA .....T.....A.....K..A..L...A.  
 HRSVA FY.ILNN...S...TQF.H.S.....A...M.E...TPR.QD.YD.  
 HRSVB FY.ILNN...S...TQF..S.....A...M.E...TPR.QD.YD.  
 BRSV FY.ILNN...S...TQF..S.....A...M.E...TPR.QD.YD.  
 PVM FY.ILNN...S...T...T.....A.....S.K.APR.R...D.

KMPV AESYAKSLKESNKINFSSLGLTDEEKAEEHFLNVSDDS-QNDYE  
 APVC .....R.....E.....N...INEEG.....  
 APVB .....R.....LAA...ED.R...TSY.GGDE.K-SQRF.  
 APVA .....RT.R.N...LAA....D.R...TSY.GGD.ER-SSKF.  
 HRSVA KA..EQ..NGV..Y.V.D..A..L..IK.Q..PK.N--DVEL-  
 HRSVB KA..EQ..NGV..Y.V.D..A..L..IKNQ..PKE.--DVEL-  
 BRSV KA..EQ..NGV..Y.V.D..T..L..IKNQ..PK.N--DVEL-  
 PVM .KD..ER..DN.V..Y.A.N..A..R.LISQQ..IV..TPDD.I-

HMPV MSFPEGKDIIFMGNEAKLAEAFQKSLRKPGHKRS-----QSIIGEK 50  
 APVC .....L.....A.....R.K.I..R.T.....V.D.  
 APVB ..L.....M.S.....Y.Q.IKNSTSV.....R.S.DP  
 APVA .....M.S...M.D.Y.R...NTSAGG.....R.S..P  
 HRSVA --M.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE.  
 HRSVB --M.KFAPE.H.ED.NNK.TK.LE.  
 BRSV --M.KFAPE.H.ED.NTK.TK.LE.  
 PVM ---M.KFAPE.V.ED.N.K..E.L.HRSF.SE.PLAGIPNTATHVTKYNM  
 100  
 HMPV VNTVSETLELPTISRPAKPTIPSEPKLAWTDKGGATKTEIKQAIKVMDPI  
 APVC II.....V.K....KST.V.T.P.R.N..GE.PDT.RSQTEE.RNEAT.E  
 APVB .S....KVP..PLCSSETS-----R.ACIRPT..STLPIK--  
 APVA I..IA.KVP..PLCN.TT.....SCI.PN..APVPKVK--  
 HRSVA --IKGKFTS.....KDPKK.DS.ISVNS.  
 HRSVB --IKGKFASS.....KDPKK.DS.ISVNS.  
 BRSV --LKGKFESS.....KDSRK.DS.ISVNSV  
 PVM PPILRSSFK..SPRVA.NL.E..A.P---TTPPP.PPQN.EEQPKESDV  
 150  
 HMPV EEEESTEKKVLPPSDGKTPAEKKLKPSNTKKK-----VSFTPNEPGKYT  
 APVC DASRLY.EVFA.T.....GKETPEKP.....T.KND.S.R..  
 APVB .V.SIYP.LPTAPP.AMIETAKPIGAPKIAQ.R----.K.ESSKA...  
 APVA .I.SIYP.LPTAPVATD.YTSTSTESAKKS.....K.DNPKV...  
 HRSVA DI.VTK.SPITSN.TIIN.TNETDDTAG.KPNYQRKPL...KEDPTPSDN  
 HRSVB DI.VTK.SPITSGTNIIN.TSEADSTPETKANYPRKPL...KEDLTPSDN  
 BRSV DI.LPK.SPITSTNQNINQPSIEINDTIAATNQVHIRKPL...KEEL.SSEN  
 PVM DI.TMHVC..PDNPEHSKKPCCSDDTD.KKT--RKPM.T.VEP.EKFVSDV  
 200  
 HMPV KLEKDALDLISD-NEEDAESSILTFEERD--TSLSIARLESIEEKLS  
 APVC ...ME..E....-..DD.....V.....K...A..L.....D...  
 APVB ...EE..E....PD.DN.EK..V.....K--NAPS.....A...  
 APVA ...EEG.E....PE.DN.EK.....K--A.T.....A...  
 HRSVA PFS.LYKETIETFDNN--E.E.SYSY..INDQ.NON..T..DR.D...  
 HRSVB PFS.LYKETIETFDNN--E.E.SYSY..INDQ.NON..T..DR.D...  
 BRSV PFTRLYKETIETFDNN--E.E.SYSYD.INDQ.NON..T..DR.D...  
 PVM LGASLYRETMQTFAADGYD.E.N.S...TNQEPG.S.V.O..DR.....  
 250  
 HMPV MILGLLRTLNIATAGPTAARDGIRDAMIGVREELIADIKEAKGK--  
 APVC .....V.....V.L.....  
 APVB ...M.K.S.....V.....NS.MA.....  
 APVA ...M.K.....M.....NS.MT..D...  
 HRSVA E..M.H..VV.S...S.....L..M.EK.RT..LMTNDRLE  
 HRSVB E..M.H..VV.S...S.....V.L..M.EK.RA..LMTNDRLE  
 BRSV E.I.M.H..VV.S.....V.L..M.EK.RS..LMTNDRLE  
 PVM Y.I..N.JMV....T..E..L..T....EM.KSDILTVNDRIV  
 300  
 HMPV -RAE4MEEEMSQRSKIGNSVLTKEAKELNKIVEBBSTSGESEBZEDP  
 APVC ---K..AK.K.....G.....  
 APVB -I..IIK..DA..A..D.....R..RML..DIS.....S.EK  
 APVA -I....K..DT..A..D.....L..DIS.....S..SG  
 HRSVA AM.RLRN..SEKMA.DTSDE.S.NPTSEK..NLL.G-----N  
 HRSVB AM.RLRN..SEKMA.DTSDE.P.NPTS.K.SDLL..-----N  
 BRSV AM.RLRD..SEKMT.DTSDE...PTSEK..MVL..-----E  
 PVM AMEKLRD..C.RADTDDGSACY..DR.RI.D..SSNA-----E  
 316  
 HMPV DTQDNQSQEDDIYQLIM  
 APVC :BESNPQ..L.S.T.  
 APVB EPDTDGEN...SFD.  
 APVA ESESDEELS..N.DL  
 HRSVA .SDNDLSLE.F-----  
 HRSVB .SDNDLSL..F-----  
 BRSV SSONDLSLE.F-----  
 PVM EAKEDLOV...MGINF

50

HMPV MESYLVDTYQGIPYTAAVQVDLIEKDLLPASLTIWFPLFQANTPPAVILLD  
 APVC .....V.....T.V...Q...R..V.V...T...T...E  
 APVB ....II....V.....V...NN..K..V.....SS..AP...  
 APVA ....II....V.....SN..T..V.....SS..AP...  
 HRSVA ..T.VNKLHE.ST.....YNVL..DD.....V.M..SSM.ADL.IK  
 HRSVB ..T.VNKLHE.ST.....YNVL..DD.....V.M..SSV.ADL.IK  
 BRSV ..T.VNKLHE.ST.....YNV..DD.....V.M..SSISADL.IK  
 PVM ..A...EM.H.V.....LN.V..HSANI..V.I.M..TSL.KNSVM.

100

HMPV QLKTLTITLYAASQNGPILKVNASAQGAMSVLPKKFEVNATVALDEYS  
 APVC .....T.....A...S.D.S.S...D..  
 APVB ....S..Q.TV.PE..V.Q..T.....A.....S.S.AA.....  
 APVA ....S..Q.T..PE..V.Q..A.....A.....A.S.A.....  
 HRSVA E.ANVN.LVKQISTPK..S.R.MINSRS.VLAQM.S..TIC.N.S...R.  
 HRSVB E.ASIN.LVKQISTPK..S.R.TINSRS.VLAQM.SN.IIS.N.S...R.  
 BRSV E.INVN.LVRQISTLK..S..IMINSRS.VLAQM.S..TIS.N.S...R.  
 PVM L.HDV.VICTQISTVH..MI..DL.SSN.GLATM.RQ.LI..II...DNG

150

HMPV KLEFKLTVCEVKTVYLTTMKPYGMVSKFVSSAKSGRKTHDLIALCDFM  
 APVC .....L.A.....N..A.....L  
 APVB ..D.GV....D.RA....L.....I.TNMNT..R.....I  
 APVA R...GT....D.RSI....L.....IMTDVR..R.....I  
 HRSVA ..AY.VT.P..I.ACS..CL.SKN.LTTVKDLTMKTLNP..I....E.E  
 HRSVB ..AY.VT.P..I.ACS..CL.VKS.LTTVKDLTMKTFNP..EI....E.E  
 BRSV ..AY.IT.P..I.ACS..CL.VKN.LTTVKDLTMKTFNP..EI....E.E  
 PVM NMHDYEVPAFDK.SFCV.IL..KN.LYTVP.ITP-TNRP..E...V.S.H

200

HMPV DLEKNTPTIPAFIKSVSTIKESESATVEAISSEADQALTOAKIAPYAGL  
 APVC ....GV.....Y.....G.....I...R.....  
 APVB ..M.RGI.....Y..A...D.....G.....I...R.....  
 APVA ..I..GV.I.....Y..A...D.....G.....I...R.....  
 HRSVA NIVTSKK.I..TYLR.I.VRNKDLN.L.NITTT.FKN.I.N...I..S..  
 HRSVB NIMTSKR.I..TYLRPI.V.NKDLNSL.NIATT.FKN.I.N...I....  
 BRSV NIMTSKR.V..T.LR.INV.AKDLDLS.NIATT.FKN.I.N...I....  
 PVM NRVTLKSFN..V..RALY.RQQGLDS..Q....DV.H.I.T.RV.....

250

HMPV IMIMTMNNPKGIKKLGAGTQVIVELGAYVQAESISKICKTWSHQGTRYV  
 APVC .....V.....R..RN.....  
 APVB ..LL.A.....R.....P.....LG.....N..R...I  
 APVA ..L.....M.....P.....LG.....N..R...  
 HRSVA LLVI.VTDN..A..YIKPQS.F..D...LEK...YYVTTN.K.TA..FA  
 HRSVB VLVI.VTDN..A..YIKPQS.F..D...LEK...YYVTTN.K.TA..FS  
 BRSV VLVI.VTDN..A..YIKPQS.F..D...LEK...YYVTTN.K.TA.KFS  
 PVM TLVINITST..A..L.K..S.ILA...P.LTQV.LHDVIMM.K.T..S.I

258

HMPV LKSRA---  
 APVC ....---  
 APVB ....---  
 APVA ..R..---  
 HRSVA I..PMED--  
 HRSVB I..PLED--  
 BRSV I..PIED--  
 PVM ...SSTSG

Фиг. 10

Фиг. 11

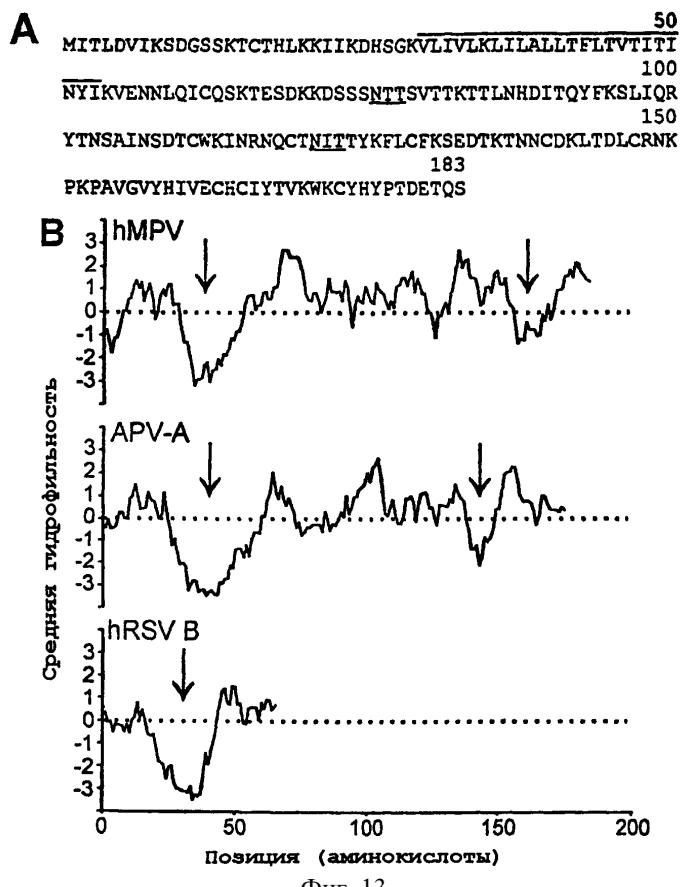
## A

HMPV MSRKAPCKY.EVRGKONEGSECKENHNYWSWPDRY.LLIRSNYLINOLEKNT 50  
 APVC .....L.....  
 APVB ..GRN..R..T..R....S.T.....HV..V.A..M....V...  
 APVA ..RN..R..I.....S.T.....HV..V.A..M.....  
 HRSVA ..RN..F.I..H.LN.KR.H.S...FE..PHA..V.Q.FM..RI.KSM  
 HRSVB ..RN..F.I..H.LN.RR.HYS...FE..PHA..V.Q.FM..KI.KSM  
 BRSV ..RN.....I..H.LN.KK.H.S...FE..PHA..V.Q.FM..KI.KSM  
 PVM ..VR...F..Q.F.S..RN..YS.K..E..LKT.ML.Q..M..RIY.FL  
 # 100  
 HMPV DRA-DGLSI[SGA]GREDTQDFWLGSTNVQGYIDDNQSITKAAACYSIH  
 APVC ..S-..L...D.....N...N.EN...ST....Y  
 APVB ..T-..L.....A....N..EG.AT...S.....Y  
 APVA ..T-..L.....A....N..EG.TT...S.....Y  
 HRSVA .KSI.T..E....AEL..EEYA..VVG.LES..GSINN...QS..VAMS  
 HRSVB .KSI.T..E....AEL..EEYA..IVG.LES..GSINN...QS..VAMS  
 BRSV ..NN.T..E....AEL..EEYA..VIG.LES.LGSINN...QS..VAMS  
 PVM ..TNT.AI.DV..FDAPQ..AEYA..TIG.LKS.LEKTNN...SI..G..I  
 150  
 HMPV NIIKQLQEVEVRQARDNKLSDSKHVALHNLVLSYMEMS-KTPASLINNLK  
 APVC .....TD.....VD.....  
 APVB .....ND.KS..LMVD.P.....ID..-N..N..S..  
 APVA .....ND.KTS..SM.E.P.....I..VD..-N.....S..  
 HRSVA KLLTE.NSDDIKKL..EELN.PKIRVY.T.I..I.SNR.NNKQT.HL..  
 HRSVB KLLIEINSDDIKKL..EEP.NPKIRVY.T.I..I.SNR.NNKQT.HL..  
 BRSV KLLAEINNDDIKRL.NKEVPT.PKIRIY.T.I..IDSNKRNTKQT.HL..  
 PVM TVLQN.DVGL.I....SNTE.TNYLRSC.TI...IDKIL.K-RQI.HI..  
 195  
 HMPV RLPREKLKKLAKLIIDLSAGRE--NDSSYALQDSESTNQVO---  
 APVC K..K.....E....V...-..TA.M...ANSD---  
 APVB ...K.....I..Q....S.GE.AN.NT..KGD.S.-----  
 APVA .....I..LQ....P..SD.A.GNT..KGD.N.-----  
 HRSVA ...ADV...TI.NTL.IHKSITIN.PKESTVS.TNDHAIGNDTT-  
 HRSVB ...ADV...TI.NTL.IHKSIIIS.PKESTVN.QNDQTQNNDITG  
 BRSV ...ADV...TI.NT..IHNEINGN.QGDIIVNEQNE-----  
 PVM ...VGV.CN.IQSV.SIEEKINSSMKT-----

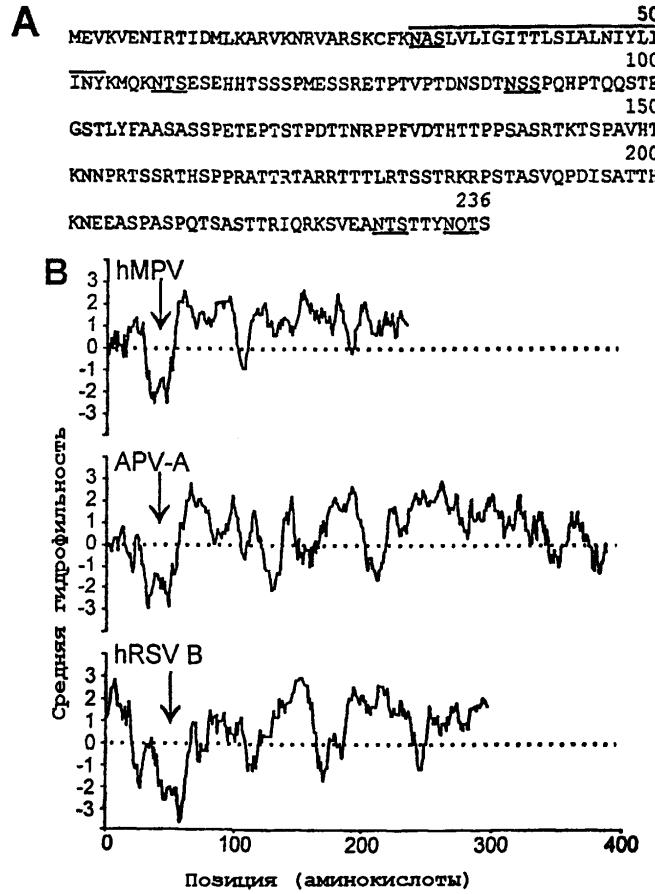
## B

50  
 HMPV -----MTLHMP-CKTVKALIKCS-----EHGPVFITIEVDDMIW  
 APVC -----..QL...I.QT...G-----..LI.LKMKL...V.  
 APVB -----PIVI...R.T.V.R.N-----TL.VCLFKRTYEHN.I  
 APVA -----PVVI...RR.T.I...N-----AL.LCMVRKIY.YS.A  
 HRSVA MTMPKIMILPDKY.-.SITSI..TSRCRVTMNYNQKNTLY.NQNNPNHHMY  
 HRSVB MTKPKIMILPDKY.-.SISSI..SSESMLATFNHKNLQ.NHNHL.NHQR  
 BRSV MNNSNIIIFPEKY.-.SISSL..NENDVIVLSHQNVLQFLQFQYPCNMY  
 PVM MQSDPICHLRGEDKFFYENRM.RLPKYYPAILHCKMYIIRVNRNLTYDGS  
 97  
 HMPV THKDLKEA---L---SDGIVKSHTNIYNCYLENIEIIYVKAYLS---  
 APVC .KNE.VDI---I---.TE...V.A..FK.R..D.....TF..---  
 APVB NLG..I.E---V---ARM.IID.I.RKQ.NECRKDFEF.AV.T.YT--  
 APVA SWS..I.E---V---ANMVLID.I.RKQ.VECRKDFFIAI.T.YN--  
 HRSVA SPNQTFNE---IHWT.QELIDTIQ.FLQHLGIIED.YTIYILV.---  
 HRSVB LLNNIFDE---IHWT.PKNLLDATQQFLQHNLIPED.YTIYILV.---  
 BRSV SQNHMLDD---IYWT.QELIEDVLK.LHLSGIS.SKYVIYVLV---  
 PVM GPSTIID.GKSVVWNRVDVIACVKEALC.IEFSWNQVIIDFDYSQAR

Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

**A** 674

HMPV	NYIAR	SIVTDLSKFNOA	RYETTAICADVADELHGTQSLFCWLHLIVPM
APVA	.....	.....	SV.....T.SS
HRSVA	...SKC	..I.....	SC..S..L....V....F....AI.H
HRSVB	...SKC	..I.....	SC..S..L....V....S....TI.L
BRSV	...SKC	..I.....	SC..S..L....V....S....TI.F
HPIV2	FELSAG	F.T...A.YCLQW	Q.IIHF.RTLNRMY.VPH..E.I..RLIR
NDV	RRRVA	F.T...Q.YCLNW	Q.IKLF.RAINQ.M.LPHF.E.I..RLMD
SV	YETLS	CFLT..K.YCLNW	F.S..LFGQRCN.IF.FKTF.N.M.PVLEK
HPIV3	YETVSC	FLT..K.YCLNW	S..LFGETCNQIF.LNK..N..PRLEG
MV	YETVS	F.T..K.YCLNW	ISLF.QRLN.IY.LP.F.Q..KRLET
NIPAH	FDTVS	FLT..K.YCLNW	SM..F.ERL..IY.LPGF.N.M.KRLET

**B** 723

HMPV	TTMICAYRHAPPETKG	EYDIDKIEEQSGLYRYHMGGIEGWCQKLWTMEA
APVA	.....T.....	D.G.-I....Q.P.....F.....M.....
HRSVA	V.I..T.....	YIRDHIV.LNNVD.....I..
HRSVB	V.I..T.....	FI.DHVVNLNEVD.....I..
BRSV	A.V..T.....	YIRNHIT.LN.VD.....I..
HPIV2	S.LYVGDPFN..AATD-AF.L..	VLNGLIFIVSK-.....L..M..IS
NDV	...FVGDPFN..SDPT-DC.	LSRVPNDDIYIVSAR.....L.....IS
SV	C.IYVGDPYC.VADRM-HRQLQDHADSGIFIHNP	R.....Y.....LIS
HPIV3	S.IYVGDPYC..SD.E-HISLEDHPDSGFYVHNPR	.....F.....LIS
MV	SVLYVSDF.C..DLDA-HIPLY.VPNDCIFIK.P	.....Y.....IST
NIPAH	SVIYV.DPNC..NIDK-HMELE.TP.DUFIH.PK	.....YS..T..LAT

**C** 772

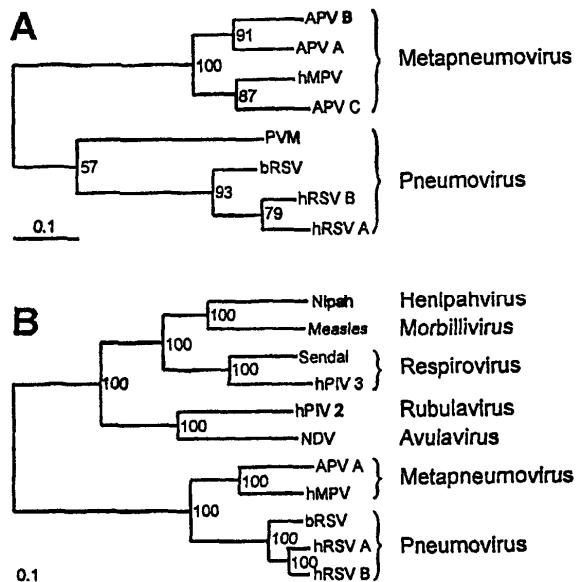
HMPV	ISL.DVVSVKTRCOMISLLNGDNQS	1DVSKPVKLSEG-LDEVKADYSLAV
APVA	.....RN.V.L.....	.....R.TGA-QT.IQ.....I
HRSVA	...LI.L.GKFSI.A.I.....	I.....R.M..-QTHAQ..L..L
HRSVB	...LI.L.GKFSI.A.I.....	I.....R.I..-QTHAQ..L..L
BRSV	...LI.I.GKFSI.A.I.....	I.....I..N..-QTHAQ..L..L
HPIV2	..VITLS.AESKTRVM.MVQ....	A.A.TTR.PR.LPSIQKKELA.AASK
NDV	.AAIQLAAARSH.RVACMVQ....	V.A.TRE.RSDDSPEMVLTQLHQASD
SV	..AIHLAA.RVGVRVSAMVQ....	A.A.TSR.PVAQTYKQKKNHV.EEIT
HPIV3	..AIHLAA.RIGVRVAMVQ....	A.A.TTR.PNMYDYRIKKEIV.KDV.
MV	.PY..LAAYESGVRL..VQ....	T.A.T.R.PSTWPYNLKKREAARVTR
NIPAH	PF.FLSAYE.NTRIPAVO	E..AITQK.HPNLPYKVKEICAKQ.Q

**D** 822

HMPV	KMLKEIRDAYRNIGHKLKEGETYISRDLQFISKV	IQSEGVMHPTPIKKEL
APVA	...TAV....Y.....V.....M..T.....	Y.AA...V.
HRSVA	NS..LLYKE.AG.....GT.....	M..M..T..HN..YY.AS...V.
HRSVB	NS..LLYKE.AG.....GT.....	M..M..T..HN..YY.AS...V.
BRSV	..LLYKE.AS.....GT.....	M..M..T..HN..YY.AS...V.
HPIV2	LFFERL.ANNYGL..Q..AQ..I..	STFFIY..RVFYQ.RILTQAL.NFS
NDV	NFF..LIHVNLH..N..DR..IR.	DTFFIY..R.FKD.AILSQL.NSS
SV	RYFGAL.HVMFD..E..LN..I..	SKMFVY..R.YYD.KIL.QCL.ALT
HPIV3	RFFDSL.EVMDDL..E..LN..I..	SKMFVY..R.YYD.RIL.QAL.ALS
MV	DYFVIL.QRLHD..H..AN..IV.	SKMFVY..G.YYD.LLVSQL.S..A
NIPAH	LYFERL.MNL.AL..N..AT..I..	TH.FIY..K.YYD.AVLSQL.SMS

847

HMPV	RVGPWINTILDDIKTSAESIGSLCQ
APVA	.....M.A.....
HRSVA	.....F.V.L.....T.
HRSVB	.....F.V.L.....T.
BRSV	.....F.V.M.....T.
HPIV2	KLCLTADVLGECTQA.CSNSATTIM
NDV	KLVLVSGDLSENTVM.CAN.A.TVA
SV	.CVF.SE.LV.ENRSACSN.STSIA
HPIV3	.CVF.SE.VI.ETRSASSNLATSFA
MV	.CVF.SE..V.ETRAACSN.ATTMA
NIPAH	.CCF.SE.LV.ETRSACSN.STTIA



Фиг. 16

A

Поз., ORF	Терминирующий кодон	Некодирующая последовательность	Начало гена	Стартовый кодон	Поз., ORF
1, Le		ACGAGAAAAAAACGCGUAAAUAAGAUUCCAAAAAAAU.....	GGGACAAGUGAAA	AUG	55, N
1237, N	<u>UAA</u> <u>UUAAAAGU</u> .....		GGGACAAGUCAAA	AUG	1263, P
2145, P	<u>UAG</u> <u>UUUAAAUAACAU</u> .....		GGGACAAGUAAAA	AUG	2180, M
2942, M	<u>UAA</u> <u>CAACCAAGCACCUUGGCCAGAGCUACUACCCUAUCUCAUAGAUCAAAAAGUCACCAUUCUAGUUAU</u> <u>AAAAAUCAAGUAGAACAGAUUAAAUCRAUCAAGAAC</u> .....		GGGACAAAUA	AAA AUG	3067, F
4684, F	<u>UAG</u> <u>UUAAUUAUAAAUAAGUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAU</u> .....		GGGACAAU	CAUA AUG	4752, M2
5476, M2	<u>UAG</u> <u>UAAAACACAUAGAGU</u> .....		GGGAUAAA	AUGACA AUG	5509, SH
6058, SH	<u>UAA</u> <u>AUGUUACACCAAGUUAAGGAUCCUAGCUGUAGUUCACAUU</u> <u>UAGUUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAU</u> <u>AAAACAGUAGUUUCUAGUACUUCUAAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAU</u> <u>AAAUCGAAACCUAACAUUCAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAUAAAUAU</u> .....		GGGACA	AGUAGUU AUG	6262, G
6970, G	<u>UAA</u> <u>CAAAAAAAUACAAAUAACCUUAGAUAACCAAGCAGACACCAACAAU</u> <u>UAGGAGAAGCCAAAAGCAGACACCAACCAUUAUAGCUCUGCCCAAAUCUCCUUGGAAAAACACTUCGCCCA</u> <u>UUAUACCAAAUACACACACACCCCCAAGAUAACACACACCCAA</u> .....		GAGACA	AAA UACA AUG	7182, L
13197, L	<u>UGA</u> <u>AAAUAUGUAUAAAUAUAGGUGACAAUCUACAUUCCAAAGUUAUCAUUAUAGAUU</u> <u>ADGCPAUU AUGUAUAGUUAUAAAUAUACAUUAUAGAUUAGAACUACACUGUCAUUAUAGUUAUAAAUAUAAAUA</u> <u>UAAGAAUUAUAAAUAUAGGUGAUUAUACGGUUUUAUUCUGU</u> .....				13378. Конц.

B

hMPV Конц. : 5' ACGAGAAAAAAAACCGUAUACAUCCAUUUAUUUCUUUAUUUA  
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||  
 5' ACGAGAAAAAAAACCGUAUACAUCCAUUUAUUUCUUUAUUUA

24. ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ РЫНКА АССИСТАНТов 1000

Фиг. 17

Сравнение двух изолятов-прототипов  
hMPV с APV-A и APV-C

Матрицы подобия ДНК

N	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,862	0,757	0,660
99-1	---	1,000	0,757	0,663
APVC	---	---	1,000	0,656
APVA	---	---	---	1,000

P	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,811	0,677	0,588
99-1	---	1,000	0,674	0,593
APVC	---	---	1,000	0,584
APVA	---	---	---	1,000

M	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,865	0,766	0,695
99-1	---	1,000	0,773	0,707
APVC	---	---	1,000	0,705
APVA	---	---	---	1,000

F	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,838	0,706	0,662
99-1	---	1,000	0,716	0,655
APVC	---	---	1,000	0,685
APVA	---	---	---	1,000

M2-1	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,863	0,764	0,668
99-1	---	1,000	0,744	0,657
APVC	---	---	1,000	0,670
APVA	---	---	---	1,000

M2-2	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,861	0,648	0,486
99-1	---	1,000	0,675	0,486
APVC	---	---	1,000	0,463
APVA	---	---	---	1,000

SH	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,688	N.A.	0,421
99-1	---	1,000	N.A.	0,380
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

G	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,543	N.A.	0,262
99-1	---	1,000	N.A.	0,263
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

Фиг. 18а

S'L	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,835	N.A.	0,596
99-1	---	1,000	N.A.	0,605
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

5'L: доступны только первые 1500 нуклеотидов 99-1  
 N.A.: последовательность недоступна

Фиг. 18б

Матрицы подобия белка

<u>N</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,949	0,880	
99-1	---	1,000	0,883	
APVC	---	---	1,000	
APVA	---	---	---	
			1,000	
<u>P</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,860	0,683	
99-1	---	1,000	0,676	
APVC	---	---	1,000	
APVA	---	---	---	
			1,000	
<u>M</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,976	0,874	
99-1	---	1,000	0,874	
APVC	---	---	1,000	
APVA	---	---	---	
			1,000	
<u>F</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,938	0,810	
99-1	---	1,000	0,803	
APVC	---	---	1,000	
APVA	---	---	---	
			1,000	
<u>M2-1</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,946	0,844	
99-1	---	1,000	0,834	
APVC	---	---	1,000	
APVA	---	---	---	
			1,000	
<u>M2-2</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,901	0,563	
99-1	---	1,000	0,577	
APVC	---	---	1,000	
APVA	---	---	---	
			1,000	
<u>SH</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,570	N.A.	
99-1	---	1,000	N.A.	
APVC	---	---	N.A.	
APVA	---	---	---	
			1,000	
<u>G</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,326	N.A.	
99-1	---	1,000	N.A.	
APVC	---	---	N.A.	
APVA	---	---	---	
			1,000	
<u>5'L</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,921	N.A.	
99-1	---	1,000	N.A.	
APVC	---	---	N.A.	
APVA	---	---	---	
			1,000	

5'L: доступны только первые 500 аминокислотных остатков  
99-1

N.A.: последовательность недоступна

Выравнивание аминокислотной последовательности двух изолятов-прототипов hMPV

Нуклеопротеин (N)

	10	20	30	40	50	60																																									
00-1	MSLQGIHLSDSL	SYKHA	I	KLESQYT	IKR	DVGTTA	VTPSSL	QQEIT	LLCGEILY	A	KHADYK	60																																			
99-1	MSLQGIHLSDSL	SYKHA	I	KLESQYT	IKR	DVGTTA	VTPSSL	QQEIT	LLCGEILY	T	KHADYK	60																																			
	70	80	90	100	110	120																																									
00-1	YAAEIGI	QYI	STALG	SERVQQ	I	LRNSG	SEVQ	VVL	TRT	YSLGK	I	KNNKG	EDLQML	DIHGVE	120																																
99-1	YAAEIGI	QYI	STALG	SERVQQ	I	LRNSG	SEVQ	VVL	T	KTYSLGK	G	KNSKG	EEELQML	DIHGVE	120																																
	130	140	150	160	170	180																																									
00-1	KSW	VEE	I	DKE	ARKT	M	T	LLK	ESS	SGN	I	P	QNQR	PSAP	DTP	I	LLC	VGAL	I	FTK	L	AST	I	EVGL	180																						
99-1	KSW	IEE	I	DKE	ARKT	M	T	LLK	ESS	SGN	I	P	QNQR	PSAP	DTP	I	LLC	VGAL	I	FTK	L	AST	I	EVGL	180																						
	190	200	210	220	230	240																																									
00-1	ETTV	RRA	N	R	V	L	S	D	A	L	K	R	Y	P	R	M	I	P	K	I	A	R	S	F	Y	D	L	E	G	S	S	S	T	G	K	A	S	240									
99-1	ETTV	RRA	N	R	V	L	S	D	A	L	K	R	Y	P	R	M	I	P	K	I	A	R	S	F	Y	D	L	E	G	S	S	S	T	G	K	A	S	240									
	250	260	270	280	290	300																																									
00-1	ESLFVN	I	FMQAYGAG	Q	T	M	L	R	G	V	I	A	R	S	N	N	I	M	L	G	H	V	S	V	Q	A	E	L	K	Q	V	T	E	V	D	L	V	R	E	M	G	P	E	G	300		
99-1	ESLFVN	I	FMQAYGAG	Q	T	M	L	R	G	V	I	A	R	S	N	N	I	M	L	G	H	V	S	V	Q	S	E	L	Q	V	T	E	V	D	L	V	R	E	M	G	P	E	G	300			
	310	320	330	340	350	360																																									
00-1	LLH	L	RQSP	KAG	LL	S	L	AN	C	P	N	F	A	S	V	V	L	G	N	A	S	G	L	I	I	G	M	Y	R	G	R	P	N	T	E	F	S	A	E	Y	A	K	S	L	K	E	360
99-1	LLH	L	RQSP	KAG	LL	S	L	AN	C	P	N	F	A	S	V	V	L	G	N	A	S	G	L	I	I	G	M	Y	R	G	R	P	N	T	E	F	S	A	E	Y	A	R	S	L	K	E	360
	370	380	390																																												
00-1	SNKINF	S	SLGLT	D	E	E	K	A	A	E	H	F	L	N	V	S	D	D	S	Q	N	D	Y	E	394																						
99-1	SNKINF	S	SLGLT	D	E	E	K	A	A	E	H	F	L	N	M	S	G	D	N	Q	D	D	Y	E	394																						

Фиг. 20

Фосфопротеин (Р)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MSFPEGKDI <del>L</del> FMGN <del>E</del> AAKLA <del>E</del> AFQKSLR <del>K</del> GHKRSQSII <del>G</del> EKVNTVSET <del>L</del> ELPTISRPAK	60				
99-1	MSFPEGKDI <del>L</del> FMGN <del>E</del> AAKIA <del>E</del> AFQKSLK <del>K</del> GHKRTQSIVGEKVNTISET <del>L</del> ELPTISKPAR	60				
	70	80	90	100	110	120
00-1	PTIPSEPKLAW <del>T</del> D <del>K</del> GGATKTE <del>I</del> KOAIKVMDPIEEEESTEKKVLPSSDGKTPAEKK <del>I</del> KEST	120				
99-1	SSTLLEPKLAW <del>A</del> DN <del>S</del> G <del>I</del> TKIT <del>E</del> KP <del>A</del> KT <del>T</del> DPV <del>E</del> EEEFNEKKVLPSSDGKTPAEKK <del>S</del> KEST	120				
	130	140	150	160	170	180
00-1	NTKKKVSFT <del>P</del> NEPGKYTKLEKD <del>A</del> LD <del>L</del> SDNEEDAESSIL <del>T</del> FEERDTSSLSIEARLESIE	180				
99-1	SVKKKVSFT <del>S</del> NEPGKYTKLEKD <del>A</del> LD <del>L</del> SDNEEDAESSIL <del>T</del> FEEKDTSSLSIEARLESIE	180				
	190	200	210	220	230	240
00-1	EKLSMILG <del>L</del> RTLN <del>I</del> ATAGPTAARDGIRDAMIGVREELIADIKEAKGKAAEMMEEEMSQ	240				
99-1	EKLSMILG <del>L</del> RTLN <del>I</del> ATAGPTAARDGIRDAMIGIREELIAEIKEAKGKAAEMMEEEMNQ	240				
	250	260	270	280	290	
00-1	RSKIGNGSVKL <del>T</del> EKA <del>K</del> ELNK <del>I</del> VEDESTSGESEEEEPKDTQDN <del>S</del> QEDDIYQLIM	294				
99-1	RSKIGNGSVKL <del>T</del> EKA <del>K</del> ELNK <del>I</del> VEDESTSGESEEEEPKETQDN <del>N</del> QEDDIYQLIM	294				

Фиг. 21

Матриксный белок (М)

	10	20	30	40	50	60
00-1	ME <del>S</del> YLVDTYQG <del>I</del> PYTAAVQVDL <del>I</del> EKD <del>L</del> LPASL <del>T</del> IWFPLFQANTPPAV <del>L</del> DQLKT <del>L</del> TIT <del>T</del> L	60				
99-1	ME <del>S</del> YLVDTYQG <del>I</del> PYTAAVQVDL <del>V</del> EKD <del>L</del> LPASL <del>T</del> IWFPLFQANTPPAV <del>L</del> DQLKT <del>L</del> TIT <del>T</del> L	60				
	70	80	90	100	110	120
00-1	YAASQNGPILKVN <del>A</del> QGAAMSVLPKKF <del>V</del> NATVALDEYSK <del>L</del> FDKLT <del>V</del> CEV <del>K</del> TV <del>Y</del> LT <del>T</del> TM	120				
99-1	YAASQNGPILKVN <del>A</del> QGAAMSVLPKKF <del>V</del> NATVALDEYSK <del>L</del> DFDKLT <del>V</del> CDV <del>K</del> TV <del>Y</del> LT <del>T</del> TM	120				
	130	140	150	160	170	180
00-1	KPYGMVSKFVSSAKSVGKK <del>T</del> HD <del>L</del> IALCDFMDLEK <del>N</del> IPVTIPAFIKSVSIKESESATVEAA	180				
99-1	KPYGMVSKFVSSAKSVGKK <del>T</del> HD <del>L</del> IALCDFMDLEK <del>N</del> IPVTIPAFIKSVSIKESESATVEAA	180				
	190	200	210	220	230	240
00-1	ISSEADQALTQAKI <del>A</del> PYAGLIMIMTMNNPKG <del>I</del> F <del>K</del> KL <del>G</del> AGTQV <del>V</del> IELGAYVQAESISKICK	240				
99-1	ISSEADQALTQAKI <del>A</del> PYAGLIMIMTMNNPKG <del>I</del> F <del>K</del> KL <del>G</del> AGTQV <del>V</del> IELGAYVQAESISRICK	240				
	250					
00-1	TWSHQGTRYVLKSR	254				
99-1	SWSHQGTRYVLKSR	254				

Фиг. 22

Белок слияния (F)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MSWKVVI <del>I</del> SLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTC	60				
99-1	MSWKVMI <del>I</del> IISLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTC	60				
	70	80	90	100	110	120
00-1	<del>A</del> DGPSLIKTELDTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTA	120				
99-1	<del>T</del> DGPSLIKTELDTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTA	120				
	130	140	150	160	170	180
00-1	GVIAIKTIRLESEV <del>T</del> AIK <del>A</del> LKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNL <del>T</del> RAINKN	180				
99-1	GIAIAKTIRLESEV <del>N</del> AIKGALKQTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKEFVSKNL <del>T</del> SAINRN	180				
	190	200	210	220	230	240
00-1	KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAV <del>S</del> MP <del>T</del> SAGQ	240				
99-1	KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAV <del>S</del> MP <del>T</del> SAGQ	240				
	250	260	270	280	290	300
00-1	<del>I</del> KLMLENRAMVRRKGFG <del>I</del> LIGVYGS <del>S</del> VIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSGKK <del>G</del> NYA	300				
99-1	IKLMLENRAMVRRKGFG <del>I</del> LIGVYGS <del>S</del> VIYMVQLPIFGVIDTPCWIIKAAPSC <del>S</del> EKK <del>G</del> NYA	300				
	310	320	330	340	350	360
00-1	CLLREDQGWY <del>C</del> QNAGSTVYY <del>P</del> NEKDCETRGDHVFC <del>D</del> TAAGINVAE <del>Q</del> SKECNINISTTNYP	360				
99-1	CLLREDQGWY <del>C</del> KNAGSTVYY <del>P</del> NEKDCETRGDHVFC <del>D</del> TAAGINVAE <del>Q</del> S <del>R</del> ECNINISTTNYP	360				
	370	380	390	400	410	420
00-1	CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVS <del>C</del> SIGSN <del>R</del> VGI <del>I</del> KQLNKGCSYITNQDADTV <del>T</del> I	420				
99-1	CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVS <del>C</del> SIGSN <del>R</del> VGI <del>I</del> KQLPKGCSYITNQDADTV <del>T</del> I	420				
	430	440	450	460	470	480
00-1	DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRP <del>V</del> SSFD <del>P</del> V <del>K</del> FPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI	480				
99-1	DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRP <del>V</del> SSFD <del>P</del> IKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNKI	480				
	490	500	510	520	530	
00-1	LSSAEKGNTGFIIVI <del>V</del> ILIAVLGSTM <del>I</del> VS <del>V</del> II <del>I</del> KK <del>T</del> KKPTGAPP <del>E</del> LSGV <del>T</del> N <del>G</del> FI <del>P</del> HN	539				
99-1	LNSAEKGNTGFIIVVILAVLGLTM <del>I</del> VS <del>V</del> II <del>I</del> KK <del>T</del> RKPTGAPP <del>E</del> LN <del>G</del> VT <del>N</del> EG <del>F</del> IPHS	539				

Фиг. 23

Белок 22К (M2-1)

	10	20	30	40	50	60
00-1	.... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	MSRKAPCKYEVRGKCNRGSECKFNHNYWSWPDRYLLRSNYLLNQLLRNTDRADGLSIIS	60				
99-1	MSRKAPCKYEVRGKCNRGSDCKFNHNYWSWPDRYLLRSNYLLNQLLRNTDKADGLSIIS	60				
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	GAGREDRTQDFVLGSTNVVQGYIDDNQSITKAAACYSLHNIIKQLQEVEVRQARDNKLSD	120				
99-1	GAGREDRTQDFVLGSTNVVQGYIDDNQSITKAAACYSLHNIIKQLQEVEVRQARDNKLSD	120				
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	130 140 150 160 170 180					
00-1	SKHVALHNLVLSYMEMSKTPASLINNLKRLPREKLKKLAKLIIDLSAGAENDSSYALQDS	180				
99-1	SKHVALHNLILSYMEMSKTPASLINNLKLPREKLKKLARLIIDLSAGAENDSSYALQDS	180				
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	.... ..					
00-1	ESTNQVQ 187					
99-1	ESTNQVQ 187					

Фиг. 24

Белок M2-2 (M2-2)

	10	20	30	40	50	60
00-1	.... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	MTLHMPCKTVKALIKCSEHGPVFITIEVDDMIWTHKDLKEALSDGIVKSHTNIYNCYLEN	60				
99-1	MTLHMPCKTVKALIKCSKHGPKFITIEADDMIWTHKELKEITLSDGIVKSHTNIYSCYLEN	60				
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	70					
00-1	.... ..... .					
00-1	IEIIYVKAYLS 71					
99-1	IEIIYVKTYLS 71					

Фиг. 25

Короткий гидрофобный белок (SH)

	10	20	30	40	50	60
00-1	.... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	MITLDVIKSDGSSKTC <del>TH</del> LKKIIKDHSGKV <del>L</del> VLKL <del>L</del> ALLT <del>F</del> ET <del>T</del> TITINYIKVENNLQ	60				
99-1	M <del>K</del> TLDVIKSDGSSETCNOLKKIIKKHSGKV <del>L</del> ALKL <del>L</del> ALLT <del>F</del> ET <del>T</del> TITVNYIKVENNLQ	60				
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	70 80 90 100 110 120					
00-1	.... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	ICQSKTESDKDSSNTTSV <del>T</del> KT <del>T</del> LNHDITQY <del>F</del> KSLIQR <del>T</del> NSAIN-SDTCW <del>K</del> INRNQ <del>C</del>	119				
99-1	ACQPKNESDKKV <del>T</del> KPNTT <del>S</del> T <del>T</del> IRPTPDPTVVH <del>L</del> KRLIQR <del>H</del> TNSV <del>T</del> KDSDTCW <del>R</del> IKHNQ <del>R</del>	120				
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	130 140 150 160 170 180					
00-1	.... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	TNI <del>T</del> TYKFLC <del>F</del> KSEDTKTN <del>N</del> CDK <del>L</del> TDLCRN <del>K</del> PKPAVG <del>V</del> YHIVECHCIYT <del>V</del> KW <del>K</del> CYHYPTD	179				
99-1	TNI <del>K</del> IYKFLC <del>S</del> GFTNSKG <del>T</del> DCEEP <del>T</del> ALCDKKLKT <del>I</del> VEK <del>H</del> RKAEC <del>H</del> CLHT <del>T</del> EWGCLHP---	177				
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
00-1	00-1 ETQS 183					
99-1	99-1 177					

Фиг. 26

Гликопротеин прикрепления (G)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MEVKVENIRTIDMILKARVKNRVARSKCFKNASLVLIGITTLISIALNIYLIINYKMOKNTS					60
99-1	MEVRVENIRAIIDMFKA <del>K</del> IKNIRSSRCYRNATLILIGLTALSMALNIFLIIDHATLRNMI					60
	70	80	90	100	110	120
00-1	ESEHHTSSSPMESSRETPTVPTDNSDTNSSPQHPTQ <del>Q</del> STEGSTLYFAASASSP <del>E</del> PTST					120
99-1	KTEN <del>C</del> ANMP <del>S</del> AEFSKKTPM <del>T</del> STAGPNTKPNPQ <del>Q</del> ATQ <del>Q</del> TENSTSP <del>V</del> ATPEGH <del>P</del> YTGT <del>T</del> T					120
	130	140	150	160	170	180
00-1	<del>P</del> DTTNRPPFVD <del>T</del> HTTPPSASRTK <del>T</del> SPAVHTKNNPRTSSR <del>T</del> HSPPRAT <del>T</del> RTAR <del>T</del> TTLRTS					180
99-1	SDTT <del>A</del> PQ <del>Q</del> TTDKHTAPLK <del>S</del> TNEC <del>I</del> TQ <del>T</del> TEKK <del>T</del> IRATTQ <del>K</del> REKGKENTNQ <del>T</del> TTAA <del>I</del> QTT					180
	190	200	210	220	230	
00-1	STRKR <del>P</del> STASVQPD <del>I</del> SAT <del>T</del> HKNEEASPAS <del>P</del> QTSAS <del>T</del> TRIQRKSVEANTSTTYNQTS					236
99-1	NTTNCIRNASET <del>---</del> ITTS <del>D</del> RPRTDTTQS <del>E</del> QT <del>T</del> ATDPSSPPH <del>A</del> <del>---</del>					224

Фиг. 27

N-конец белка полимеразы (L)

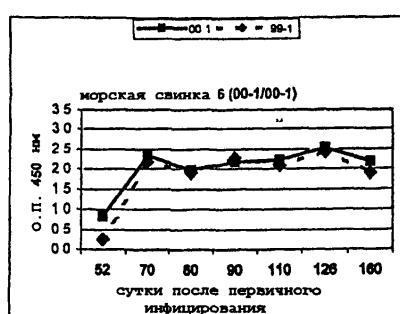
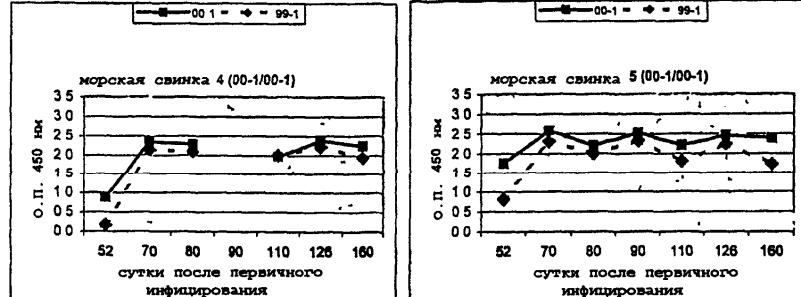
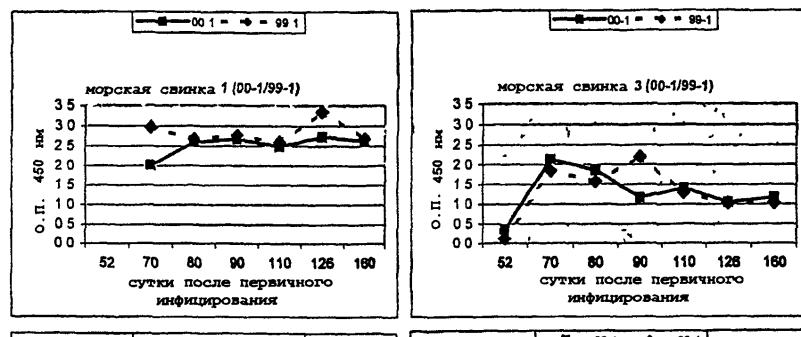
	10	20	30	40	50	60
00-1	MDP <del>N</del> ESTVN <del>V</del> YLPD <del>S</del> Y <del>L</del> KGVIS <del>F</del> SETNAIGS <del>C</del> LLKRPY <del>L</del> KNDNTAKVAIENPVIEHVRL					60
99-1	MDP <del>F</del> ESTVN <del>V</del> YLPD <del>S</del> Y <del>L</del> KGVIS <del>F</del> SETNAIGS <del>C</del> LLKRPY <del>L</del> KNDNTAKVAENPVVEHVRL					60
	70	80	90	100	110	120
00-1	KNAV <del>T</del> SKMKISDYK <del>I</del> VEPVNMQHEIMKNVHSC <del>E</del> LTLLKQFLTRSKN <del>I</del> STL <del>K</del> LN <del>M</del> ICDWLQ					120
99-1	RNAV <del>T</del> TKMKISDYK <del>V</del> VEPVNMQHEIMKNIHS <del>E</del> LTLLKQFLTRSKN <del>I</del> SSL <del>K</del> LN <del>M</del> ICDWLQ					120
	130	140	150	160	170	180
00-1	LKSTS <del>D</del> DT <del>S</del> ILSFIDVEF <del>I</del> P <del>S</del> WVSNWFSNWYNLNK <del>L</del> ILEFRKEEVIRTGSILCRSLGKLV					180
99-1	LKSTS <del>D</del> NT <del>S</del> ILNFIDVEF <del>I</del> P <del>W</del> WVSNWFSNWYNLNK <del>L</del> ILEFRREEVIRTGSILCRSLGKLV					180
	190	200	210	220	230	240
00-1	FVSSYGCIV <del>V</del> KS <del>N</del> KS <del>K</del> R <del>V</del> S <del>F</del> FTYNQ <del>L</del> LTWDV <del>M</del> LSRF <del>N</del> ANFCI <del>V</del> WS <del>N</del> SLNENQ <del>E</del> GLGLRS					240
99-1	FIVSSYGC <del>V</del> V <del>V</del> KS <del>N</del> KS <del>K</del> R <del>V</del> S <del>F</del> FTYNQ <del>L</del> LTWDV <del>M</del> LSRF <del>N</del> ANFCI <del>V</del> WS <del>N</del> N <del>K</del> NQ <del>E</del> GLGLRS					240
	250	260	270	280	290	300
00-1	NLQGILTNKLYETVDYMLS <del>L</del> CC <del>N</del> EGF <del>S</del> LV <del>K</del> FE <del>E</del> GF <del>I</del> MS <del>E</del> IL <del>R</del> IT <del>E</del> HAQFSTRFRNTLLNG					300
99-1	NLQGMLTNKLYETVDYMLS <del>L</del> CC <del>N</del> EGF <del>S</del> LV <del>K</del> FE <del>E</del> GF <del>I</del> MS <del>E</del> IL <del>K</del> IT <del>E</del> HAQFSTRFRNTLLNG					300
	310	320	330	340	350	360
00-1	LTDQLT <del>K</del> LN <del>K</del> NR <del>L</del> R <del>V</del> HGT <del>V</del> LENND <del>P</del> MYEV <del>V</del> L <del>K</del> L <del>G</del> DT <del>L</del> <del>K</del> IKLLINKNLENAAELYI					360
99-1	LTEQLS <del>V</del> L <del>K</del> LN <del>K</del> NR <del>S</del> R <del>V</del> L <del>G</del> TILENNN <del>P</del> MYEV <del>V</del> L <del>K</del> L <del>G</del> DT <del>L</del> <del>K</del> IKLLINKNLENAAELYI					360
	370	380	390	400	410	420
00-1	FRI <del>F</del> GH <del>P</del> MV <del>D</del> ER <del>D</del> AM <del>A</del> VKLN <del>E</del> IT <del>K</del> IL <del>R</del> <del>E</del> SLTEL <del>R</del> GA <del>F</del> IL <del>R</del> II <del>K</del> GF <del>V</del> DNNKRWP <del>K</del> IK <del>N</del>					420
99-1	FRI <del>F</del> GH <del>P</del> MV <del>D</del> ER <del>E</del> AM <del>A</del> VKLN <del>E</del> IT <del>K</del> IL <del>K</del> <del>E</del> SLTEL <del>R</del> GA <del>F</del> IL <del>R</del> II <del>K</del> GF <del>V</del> DNNKRWP <del>K</del> IK <del>N</del>					420
	430	440	450	460	470	480
00-1	LKVLSKRW <del>T</del> MYFKAKS <del>Y</del> PSQ <del>L</del> EL <del>S</del> QDF <del>L</del> ELAA <del>I</del> Q <del>F</del> E <del>Q</del> FS <del>V</del> PE <del>K</del> T <del>N</del> LEM <del>V</del> LN <del>D</del> K <del>A</del> IS <del>P</del> P					480
99-1	LKVLSKRW <del>T</del> MYFKAKS <del>Y</del> PSQ <del>L</del> EL <del>S</del> QDF <del>L</del> ELAA <del>V</del> Q <del>F</del> E <del>Q</del> FS <del>V</del> PE <del>K</del> T <del>N</del> LEM <del>V</del> LN <del>D</del> K <del>A</del> IS <del>P</del> P					480
	490					
00-1	KRLIWSV <del>P</del> KN <del>Y</del> LP <del>E</del> <del>K</del> IK <del>N</del> 499					
99-1	KKLIWSV <del>P</del> KN <del>Y</del> LP <del>E</del> <del>K</del> IK <del>N</del> 499					

Фиг. 28

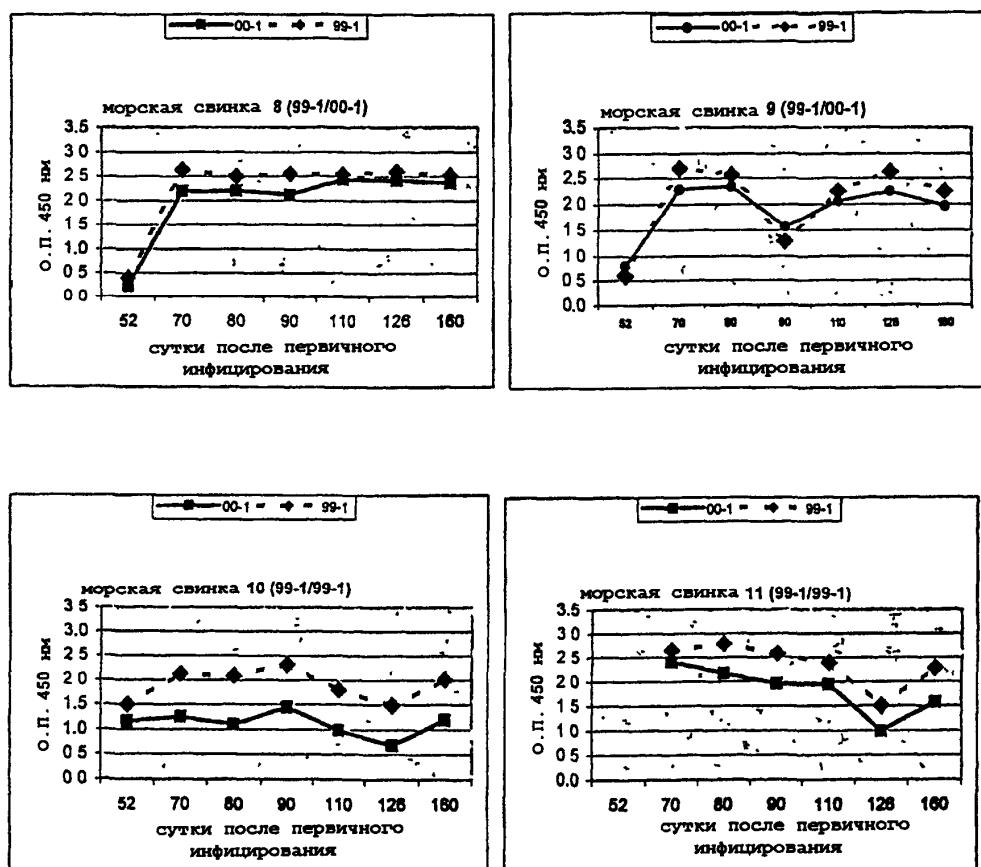
+=положительный; -=отрицательный; T=мазок из гортани;  
NO=мазок из носа; N=не проводилось; ?=ненадежный  
результат; D=умерли; 0-12: сутки после инфицирования.  
Вторичное инфицирование тестировали только на мазках из  
носса

№№	Первичное инфицирование	Мазок	0 1 2 3 4 5 8 10 11 12												Вторичное инфицирование					
			0	1	2	3	4	5	8	10	11	12		0	1	2	3	4	5	
1	00-1	T	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	99-1	N	N	N	N	N	N	
		NO	-	+	+	+	+	+	N	+	-	-		-	-	-	-	-	-	
2	00-1	T	-	+	+	+	+	+	-	-	-	D		N	N	N	N	N	N	
		NO	+	+	+	+	+	N	+	-	D		-	-	-	-	-	-	-	
3	00-1	T	-	-	?	-	-	-	-	-	N	99-1	N	N	?	N	N	N		
		NO	+	?	?	-	-	N	-	-	-		-	-	?	+	+	-		
4	00-1	T	-	+	+	+	+	-	?	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N		
		NO	-	+	+	+	+	N	?	-	-		-	-	+	-	-	-		
5	00-1	T	-	?	+	+	+	+	+	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N		
		NO	+	+	+	+	+	N	+	-	-		-	-	-	-	-	-		
6	00-1	T	-	-	+	+	+	+	-	+	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N	
		NO	-	+	+	+	+	N	+	+	?		-	-	-	-	-	-		
7	99-1	T	-	-	-	+	+	-	+D	-	-	-		N	N	N	N	N	N	
		NO	-	-	-	+	+	N	D	-	-		-	-	-	-	-	-		
8	99-1	T	-	-	+	+	-	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N		
		NO	-	?	-	+	+	?	N	-	-		-	-	+	+	+	+		
9	99-1	T	-	-	-	-	-	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N		
		NO	-	-	-	-	-	N	-	-	-		-	?	+	-	-	-		
10	99-1	T	-	-	-	+	+	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N		
		NO	-	+	+	+	+	N	-	-	-		-	-	-	-	-	-		
11	99-1	T	-	-	+	+	+	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N		
		NO	-	+	?	+	+	N	-	-	-		-	-	-	+	-	-		
12	99-1	T	-	-	+	+	?	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N		
		NO	-	+	+	+	+	N	-	-	-		-	-	-	-	-	-		

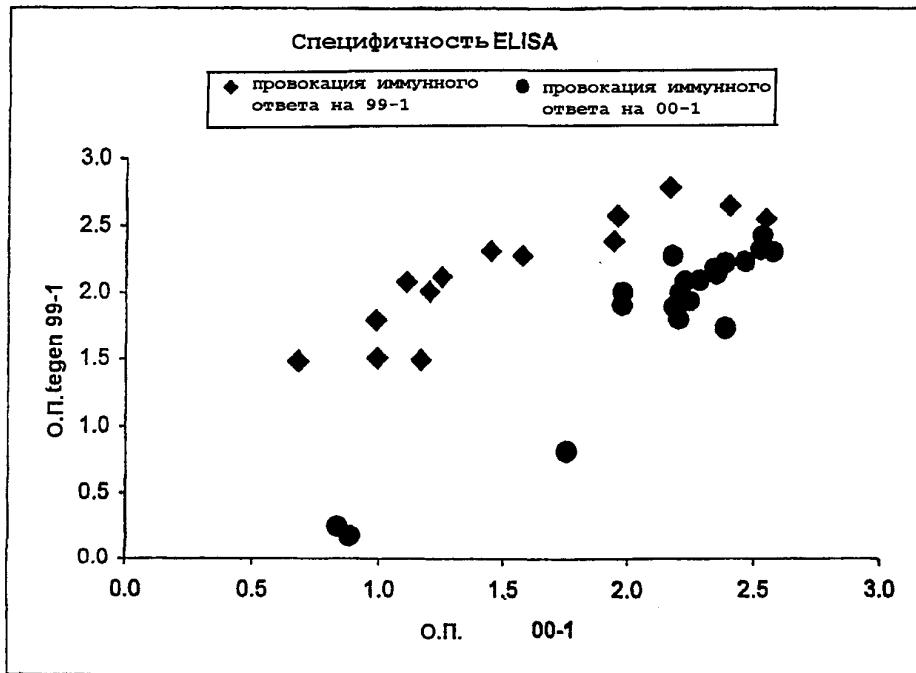
Фиг. 29



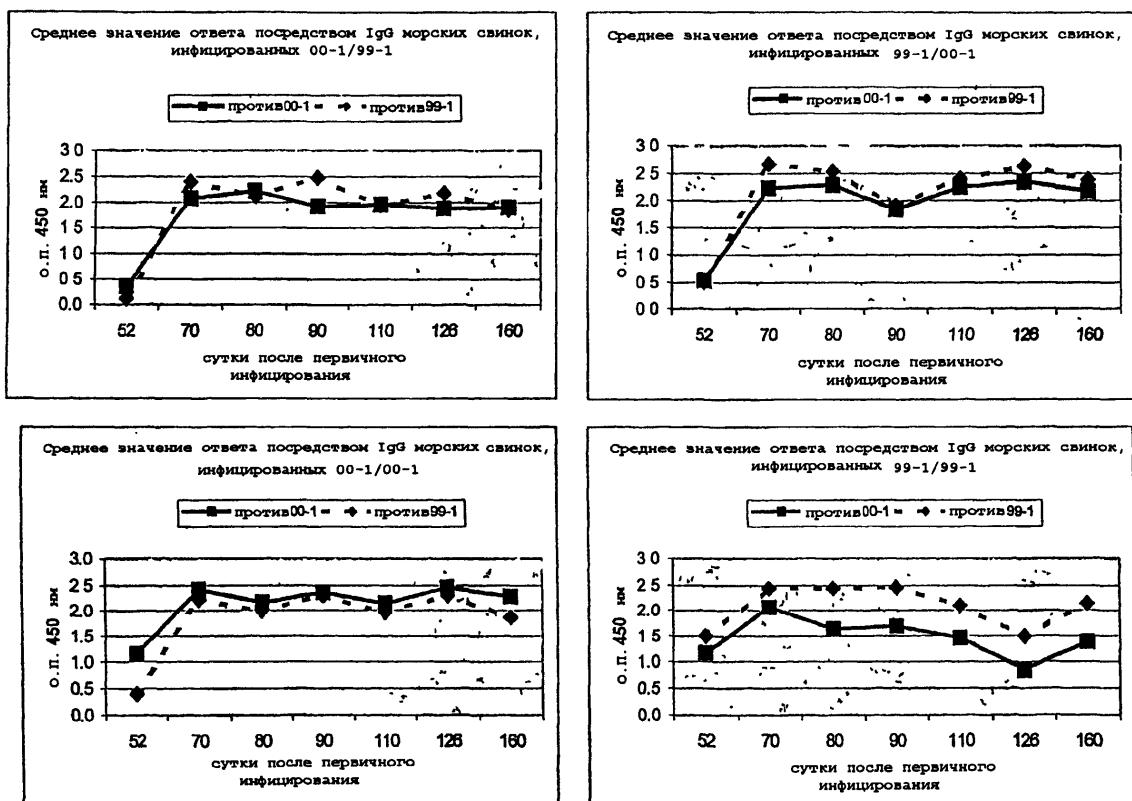
Фиг. 30А



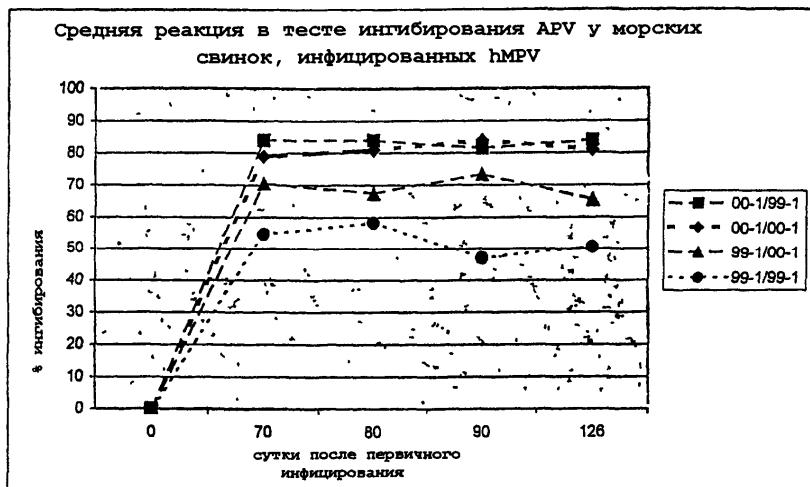
Фиг. 30В



Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33

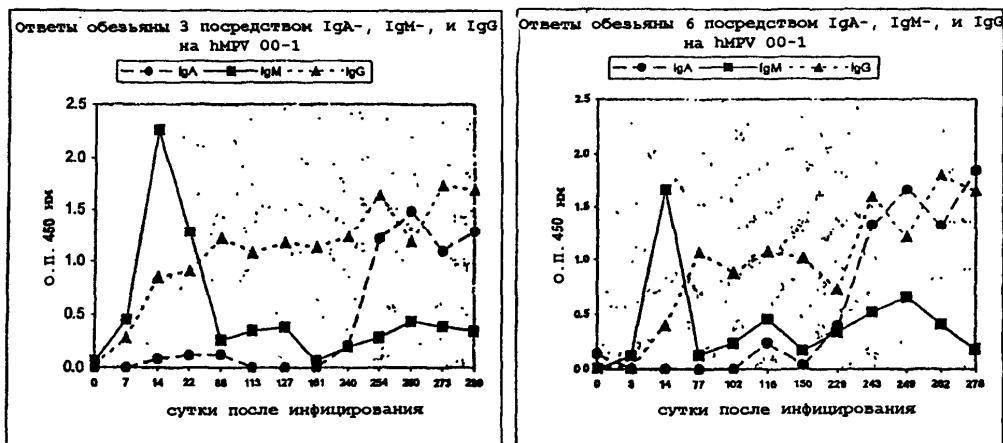
	Против 00-1	Против 99-1	Против APV-С
1 инфицирование 00-1			
2 инфицирование 00-1			
1 инфицирование 99-1			
2 инфицирование 00-1			

Фиг. 34

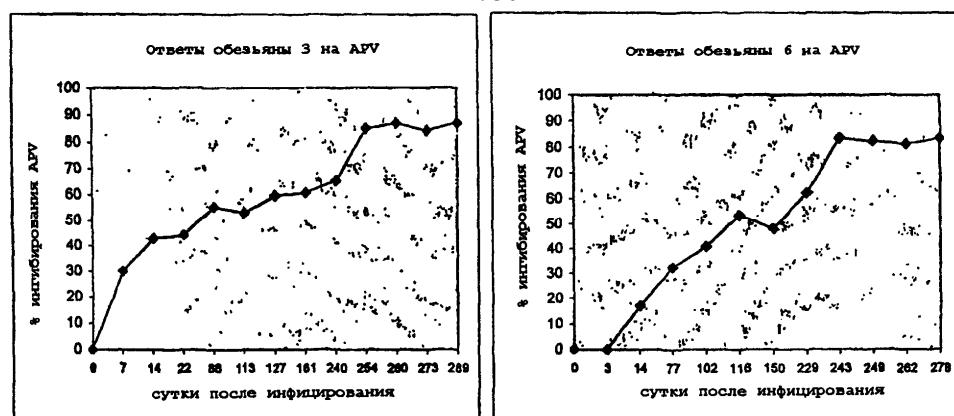
+=положительный; -=отрицательный; N=не проводилось;  
?=ненадежный результат; 0-10: сутки после инфицирования

№№	Первичное инфицирование	0	2	3	4	5	6	7	8	9	11	Вторичное инфицирование	0	1	2	3	4	5	7	10
		0	2	3	4	5	6	7	8	9	11		0	1	2	3	4	5	7	10
3	00-1	-	-	-	+	+	+	+	+	N	-	-	-	+	+	+	+	-	?	-
6	00-1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

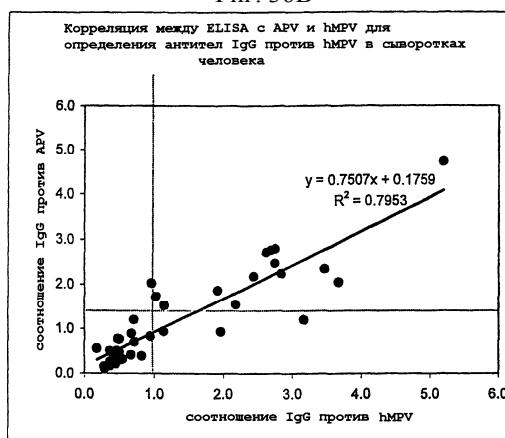
Фиг. 35



Фиг. 35



Фиг. 36A



Фиг. 37



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6